

 **PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



**KEMIAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA**

**Laboratorioalan koulutusohjelma**

**Tutkimuspainotteinen**

**OPINNÄYTETYÖ**

**KLOORIHEKSIDIINIPITOISUUS VESIROKKOVOITEESSA -  
HPLC-MENETELMÄN KEHITYS JA VALIDOINTI**

**Työn tekijä: Marjut Hiltunen  
Työn valvoja: Pirkko Pyysalo  
Työn ohjaaja: Tuula Hauta-Aho**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2007**

**Pirkko Pyysalo  
Lehtori**



## ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Yliopiston Apteekin analyttiselle laboratoriolle.

Haluan kiittää työni ohjaajaa, kemisti Tuula Hauta-Ahoa, joka mahdollisti mielenkiintoisen opinnäytetyöprojektini. Lisäksi haluan kiittää erikoisanalyttikko Aija Silanderia kärsivällisyydestä sekä arvokkaista neuvoista ja avusta, jota häneltä sain opinnäytetyöni eri vaiheissa.

Haluan kiittää myös opinnäytetyöni valvojaa, lehtori Pirkko Pyysalaa, avusta ja hyvästä ohjauksesta. Lisäksi haluan lausua kiitokset tuutoropettajalleni, Mia Ruismäelle. Hän on ollut auttava, huolehtiva ja kannustava tukipilari näiden opiskeluvuosiini aikana.

Lämmin kiitos kuuluu erityisesti ystäväilleni, jotka ovat kulkeneet rinnallani tukemassa, kannustamassa eteenpäin sekä jakamassa onnistumisen ja epäonnistumisen hetket kanssani.

Helsingissä 10.11.2007

Marjut Hiltunen



**PDF**  
Complete

Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Marjut Hiltunen	
Työn nimi: Klooriheksidiinipitoisuus vesirokkovoiteessa - HPLC-menetelmän kehitys ja validointi	
Päivämäärä: 7.11.2007	Sivumäärä: 49 s. + 12 liitettä
Koulutusohjelma:	Suuntautumisvaihtoehto:
Laboratorioalan koulutusohjelma	Tutkimuspainotteinen
Työn valvoja: lehtori, FM Pirkko Pyysalo	
Työn ohjaaja: kemisti Tuula Hauta-aho	
<p>Tässä opinnäytetyössä kehitettiin HPLC-menetelmä klooriheksidiinipitoisuuden määrittämiseksi Professorin vesirokkovoiteesta. Menetelmä kehitettiin Yliopiston Apteekin analyttiselle laboratoriolle.</p> <p>Klooriheksidiini on vesirokkovoiteessa käytetty vaikuttava aine. Se ehkäisee ja hoitaa ihon punoitusta ja turvotusta ja on nykyään tunnetuin antiseptinen aine. Klooriheksidiinipitoisuutta ei ole vesirokkovoiteesta tutkittu, eikä sen säilyvyys voiteessa ole tämän vuoksi varmaa. Yliopiston Apteekki määrittää vesirokkovoiteen käyttöiäksi kaksi vuotta. Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, onko Yliopiston Apteekin määrittelemä kahden vuoden kesto aika vesirokkovoiteelle liian pitkä. Epäiltiin, että klooriheksidiini hajoaa vesirokkovoiteessa parakloorianiliiniksi kahden vuoden aikana.</p> <p>Työn tarkoituksena oli kehittää HPLC-menetelmä klooriheksidiinipitoisuuden analysoimiseksi vesirokkovoiteesta. Työhön liittyi näytteenkäsittelyn ja uuttoliuottimen määrittäminen vesirokkovoiteelle. Kirjallisuudessa esiintyviä menetelmiä testattiin ja muokattiin tähän työhön sopiviksi. Kun menetelmän kehitys oli saatu valmiiksi, uusi menetelmä validoitiin. Validoidun menetelmän avulla analysoitiin vanhoja erävarastonäytteitä, joiden avulla selvitettiin klooriheksidiinin säilyvyys voiteessa.</p> <p>Lopputuloksena oli, että klooriheksidiini säilyy voiteessa ainakin kolme vuotta hajoamattomassa muodossa. Voiteen valmistusprosessissa oli kuitenkin parannettavaa, koska klooriheksidiinipitoisuus vaihteli huomattavasti valmistuserien välillä.</p> <p>Klooriheksidiinipitoisuuden tutkimisen aloittaminen valmistettavista eristä oli tutkimustulosten mukaan aiheellista. Vesirokkovoiteen pitoisuuden tutkimisen seurauksena on suositeltavaa aloittaa lisäksi uusi säilyvyysseurantatutkimus, joka sisältää myös pitoisuustutkimukset.</p>	
Avainsanat: vesirokko, HPLC, klooriheksidiini, p-kloorianiliini, validointi	



# ABSTRACT

Name: Marjut Hiltunen	
Title: Assay of Chlorhexidine in Chickenpox Ointment - Developing High Performance Liquid Chromatography Method and Validation	
Date: 7.11.2007	Number of pages: 49 + 12
Department: Laboratory Sciences	Study Programme: Research
Instructor: M. Sc. Pirkko Pyysalo	
Supervisor: M.Sc. (Chem.) Tuula Hauta-aho	
<p>The aim of this study was to develop high performance liquid chromatography analysis of chlorhexidine assay in Chickenpox Ointment, 'Professorin vesirokkovoide'. The method was developed for the purposes of the analytical laboratory of Pharmacy of University.</p> <p>Chlorhexidine is an effective substance in chickenpox ointment. It prevents and treats the redness and swelling of skin and it is the most popular antiseptic substance these days. The assay of chlorhexidine in the chickenpox ointment has not yet been researched. That is why it is debatable what the shelf-life of chlorhexidine in the ointment is. According to Pharmacy of University a life expectancy of the chickenpox ointment is two years. The objective of this graduate study was to find out if the life expectancy was too long. There have been doubts if chlorhexidine should degrade and thus become a degrade substance of p-chloroaniline.</p> <p>The study was started by developing a high performance liquid chromatography method for researching chlorhexidin assay of the chickenpox ointment. First of all the purpose was to develop a proper sample preparation for the chickenpox ointment. It was necessary to be able to dissolve the sample into a solvent. Literature sources gave comprehensive information for finding high performance liquid chromatography methods for chlorhexidine. The methods were tested and elaborated for the analysis. After this a new method was validated. Old samples were analysed with the new method as well. By researching the old samples it was found out how long a time chlorhexidine will be in the ointment without decomposition.</p> <p>The results of the research show that chlorhexidine is stabile in the ointment without decomposition at least three years. However, there are still some improvements to be made in the manufacturing process of the chickenpox ointment, beacuse the assay of chlorhexidine notably changes between production runs.</p> <p>The research results showed that it was justifiable to start testing the assay of chlorhexidine with new production runs. Consequently it was recommendable to start a new stability studies the analytical method of assay. This test would include a research of assay.</p>	
Keywords: chickenpox, high performance liquid chromatography, chlorhexidine, p-chloroaniline, validation	

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>YLIOPISTON APTEEKIN HISTORIAA</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TYÖN TEORIAA</b>	<b>3</b>
3.1	Vesirokko	3
3.2	Professorin vesirokkovoide	4
3.3	Klooriheksidiini	5
3.4	HPLC	6
3.4.1	HPLC-laitteiston rakenne	7
3.4.2	Eluentti	8
3.4.3	Esikolonne	9
3.4.4	Kolonne	9
<b>4</b>	<b>TYÖN TOTEUTUS</b>	<b>10</b>
4.1	Uuttoliuoksen etsiminen	10
4.2	Piikkien erottuminen ja tunnistaminen	14
4.3	Menetelmän jatkokehitys	15
4.4	Menetelmän testaus vesirokkovoiteella	17
<b>5</b>	<b>VALIDOINTIPARAMETRIEN TEORIAA</b>	<b>19</b>
5.1	Systeemin soveltuvuus	20
5.2	Lineaarisuus	20
5.3	Oikeellisuus	21
5.4	Toistettavuus	22
5.5	Spesifisyys	23
5.6	Menetelmän haavoittuvuus	24
5.7	Määritysalue	25



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	<b>STEN KÄSITTELY</b>	<b>26</b>
6.1	<b>Lineaarisuus</b>	<b>26</b>
6.2	<b>Oikeellisuus</b>	<b>30</b>
6.3	<b>Toistettavuus</b>	<b>32</b>
6.4	<b>Spesifisyys</b>	<b>34</b>
6.5	<b>Menetelmän haavoittuvuus</b>	<b>39</b>
6.6	<b>Määrittämisalue</b>	<b>43</b>
7	<b>ERÄVARASTONÄYTTEIDEN ANALYSOINTI</b>	<b>43</b>
8	<b>ONGELMATILANTEET</b>	<b>44</b>
9	<b>LAITTEISTO JA VÄLINEET</b>	<b>45</b>
10	<b>YHTEENVETO</b>	<b>46</b>
11	<b>POHDINTAA</b>	<b>47</b>
	<b>VIITTELUETTELO</b>	<b>48</b>

## **LIITTEET**

<b>LIITE 1</b>	<b>Analyysiohje</b>
<b>LIITE 2</b>	<b>Emäshajotus</b>
<b>LIITE 3</b>	<b>Happohajotus</b>
<b>LIITE 4</b>	<b>Peroksidihajotus</b>

Tämä opinnäytetyö tehtiin Yliopiston Apteekin analyttiselle laboratoriolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää HPLC-menetelmä (High Performance Liquid Chromatography) klooriheksidiinipitoisuuden määrittämiseksi Professorin vesirokkovoiteesta. Lisäksi kehitetty menetelmä validoitiin.

Yliopiston Apteekki on vuonna 1755 perustettu yritys, jonka omistaa Helsingin yliopisto. Se on Suomen suurin farmaseuttisen henkilöstön työllistäjä. Vuonna 1930 Yliopiston Apteekille perustettiin oma analyttinen laboratorio. Laboratorion työn tarkoituksena on laadunvarmistus Yliopiston Apteekkiin tulevista raaka-aineista sekä tuotteista, jotka Yliopiston Apteekki valmistaa itse. Tärkeimpiä valmistettavia tuotteita ovat Professori-sarjan tuotteet. Sarjaan kuuluu esimerkiksi yskänlääkkeitä, korvatippoja ja nenävoidetta.

Professorin vesirokkovoide on yksi Yliopiston Apteekin omista valmisteista, ja klooriheksidiini on tämän voiteen vaikuttava aine. Uusi menetelmä kehitettiin, koska klooriheksidiinin säilyvyys voiteessa oli epäselvää. Klooriheksidiinipitoisuutta voiteesta ei ollut missään vaiheessa tutkittu, mutta sen läsnäolo voiteessa oli todettu toteamiskokeilla. Yliopiston Apteekki antaa valmisteelle kestoajaksi kaksi vuotta, mutta epäiltiin, että annettu kesto aika oli liian pitkä. Mahdollisesti klooriheksidiini ei kestä voiteessa kahta vuotta hajoamatta, ja kirjallisuuden perusteella klooriheksidiini hajoaisi lämmön ja valon vaikutuksesta p-kloorianiliiniksi. Tämän vuoksi päätettiin kehittää HPLC-menetelmä, jonka avulla selvitetäisiin, kuinka pitkään lääkeaine säilyy valmisteessa hajoamatta. Lopuksi kehitetty menetelmä validoitiin.

Kokeellisessa osiossa testattiin erilaisia orgaanisia liuottimia, joihin klooriheksidiini uuttuisi voiteesta. Kirjallisuudesta löytyy muutamia HPLC-menetelmiä klooriheksidiinin tutkimiseksi. Näistä menetelmistä etsittiin testaamalla ja parantelemalla sopiva. Menetelmä validoitiin ja tutkittiin klooriheksidiinin säilyvyyttä voiteessa. Tämä pystyttiin tutkimaan Yliopiston Apteekin erävarastossa säilytettävien näytteiden avulla. Erävarastosta löytyi erikäisiä vesirokkovoiteita. Erävarasto on perustettu mahdollisten valitusten ja tuotevirheiden varalta. Jos valmisteesta tulee asiakasvalitus, on Yliopiston Apteekilla mahdollisuus tutkia siihen käytetyt raaka-aineet ja saman erän valmiste uudelleen.

haluttiin selvittää, onko klooriheksidiinipitoisuuden tutkiminen  
ellista. Jos pitoisuustutkimukset aloitetaan, on aiheellista aloit-  
taa myös uudet säilyvyysseurantatutkimukset, jotka sisältävät pitoisuustut-  
kimukset.

## 2 YLIOPISTON APTEEKIN HISTORIAA

Yliopiston Apteekki on vanhalta nimeltään Turun kuninkaallisen akatemian apteekki. Se perustettiin, jotta kaupunkilaiset saisivat parempia lääkkeitä ja lääketieteen opiskelijat voisivat seurata niiden valmistusta. [1, s. 320.]

Kun akademia sai oman kemianlaboratorion, apteekin opetustoiminnan merkitys väheni. Opetustoiminnan tukeminen kuitenkin jatkui. Alussa apteekki toimitti kemian laboratoriolle ulkomailta edullisia lääkeaineita ja kemikaaleja. Se myös uudisti lääketieteellistä tiedekuntaa. Apteekki siirtyi vuonna 1828 Helsinkiin yliopiston mukana ja alkoi tukea lääketieteellisen opetussairaalan toimintaa. Vuodesta 1870 lähtien yliopisto on saanut suoraa taloudellista tukea Yliopiston Apteekilta. Pelkästään viimeisten kymmenen vuoden aikana apteekki on tuottanut Helsingin yliopistolle lähes 200 miljoonaa euroa. Vaikka valtio on vähentänyt samalla jonkin verran omaa tukemistaan, on Yliopiston Apteekin antaman tuen hyöty ollut melkoinen. Merkittäviä apteekin osittain rahoittamia hankkeita ovat Tvärminnen eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen uudelleenrakentaminen, Viikin tiedepuistossa toimiva Drug Discovery Technology Center (DDTC) ja Meilahden sairaalakesittymän yhteyteen rakennettu lääketieteellinen tutkimuskeskus Biomedicum. [1, s. 320 - 326.]

Yliopiston Apteekki on vaikuttanut kokonsa ja organisaationsa ansiosta merkittävästi lääkejakelun tehostumiseen. Sen vaikutus olisi ollut suurempi, jos sen laajentumista ei olisi lopetettu jo 1970-luvulla. Laajentuminen lopetettiin, koska lääkelakiin tuli maininta, että apteekilla voi olla enintään 16 sivuapteekkia. [1, s. 326.]

Koska kotimaiset kasvumahdollisuudet ovat hiipuneet, on Yliopiston Apteekki alkanut laajentua ulkomaille. Sillä on toimintaa jo neljällä paikkakunnalla Virossa ja kolme apteekkia Pietarissa. [1, s. 326.]



laboratorio perustettiin 1.6.1930, kun Yliopiston Apteekki muutti  
hin Kalliolanrinteelle. Analyttisessä laboratoriossa työskenteli  
ensin ainoastaan farmaseutteja ja vuonna 1992 laboratorioon palkattiin en-  
simmäinen laborantti. Nykyään laboratoriossa työskentelee seitsemän labo-  
ranttia ja yksi kemisti. Farmaseutteja laboratoriotyössä ei enää ole.

### 3 TYÖN TEORIAA

Seuraavaksi on esitelty teoriaa, johon tämä tutkimustyö perustuu. Aluksi on esitelty vesirokon teoriaa ja sen aiheuttamiin oireisiin kehitettyä vesirokko-voidetta. Tämän jälkeen on kerrottu enemmän vaikuttavana aineena käytetystä klooriheksidiinistä. Lopuksi esitellään HPLC-laitteistoa, sekä kolonnin ja ajoliuoksen valintaan liittyvää teoriaa.

#### 3.1 Vesirokko

Vesirokon aiheuttaa Varicella zoster -virus. Se on erittäin herkästi tarttuva tauti, joka sairastetaan yleensä ennen aikuisikää. Pohjoisen vyöhykkeen maissa tautia esiintyy enemmän talvella ja keväällä, muualla ns. tropiikin maissa sitä esiintyy ympäri vuoden. [2; 3.]

Vesirokon sairastaminen saa aikaan immuniteetin, joka kestää koko eliniän [4]. Virus jää kuitenkin pysyvästi elämään tuntohermojen hermosolmukkeisiin, josta se voi aktivoitua uudelleen ja aiheuttaa vyöruusun. Lapset parantuvat taudista yleensä hyvin ja jälkitaudit ovat harvinaisia. Aikuisilla, puolustuskyvyn heikentämällä ihmisillä ja raskauden aikana oireet ovat rajumpia ja seurauksena voi olla komplikaatioita, esimerkiksi keuhkokuumetta. [3.]

Vesirokko paranee lapsilla itsestään runsaassa viikossa, mutta aikuisilla se on huomattavasti vaikeampi sairaus. Kuume voi nousta korkeaksi ja ihottumaan voi liittyä voimakasta kipua. Vesirokko voi aiheuttaa tulehdusta myös sisäelimissä. Tämän vuoksi yhteydenotto lääkäriin on tärkeää, jos potilas on aikuinen. [3.]

staan on kehitetty viruslääke ja rokote. Rokote ei kuitenkaan  
virologinen rokotushoitoon ja viruslääkettäkin annetaan vain  
poikkeustapauksissa. Poikkeustapauksia ovat potilaat, joilla on esimerkiksi  
autoimmuuninen ihottuma tai kortisonihoito tai jos kyseessä on aikuinen potilas.  
[3.]

### 3.2 Professorin vesirokkovoide

Professorin vesirokkovoide on antiseptinen ja viilentävä voide. Se on kehitet-  
ty lievittämään vesirokon aiheuttamaa ihon kutinaa ja tulehtumista. [5.]

Voide on valkoinen, miedosti mentolille tuoksuva voide, jota säilytetään huo-  
neenlämmössä. Seuraavana on esitetty vesirokkovoiteen koostumus. Yh-  
dessä grammassa voidetta on

- |                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| • Methyl.parahydroxybenz.                  | 1,5 mg    |
| • Levomenthol.                             | 5,0 mg    |
| • Ethanol. (96 per cent)                   | 40,0 mg   |
| • Chlorhexidin.digluconat.sol.             | 50,0 mg   |
| • Decyl.oleas                              | 50,0 mg   |
| • Alcohol cetylic.et stearylic.emulsific.A | 150,0 mg  |
| • Aq.purif.                                | 703,5 mg. |

Voidetta käytetään sivelemällä sitä iholle useita kertoja päivässä.

Voide on DF:n (Dispensatorium Fennicum) valmiste. DF sisältää sellaisten  
itsehoitovalmisteiden valmistusohjeet, joita voidaan valmistaa apteekissa va-  
rastoon ilman erillistä ilmoitusta Lääkelaitokselle [5]. Professorin vesirokko-  
voidetta on tutkittu laboratoriossa DF:n ohjeiden mukaan. Valmisteen laatu-  
vaatimuksen mukaisesti siitä analysoidaan voiteen ulkonäköä ja tuoksua,  
sekä tehdään toteamiskoe klooriheksidiinille.

vesirokkovoidteen vaikuttava aine on 20 % klooriheksidiinidiglukonaattiliuos.

Klooriheksidiini on väritön, vaikealiukoinen ja erittäin emäksinen aine. Alun perin, 1950-luvun alussa, klooriheksidiini syntetisoitiin malarialääkkeiden kehitystyöhön. Pian havaittiin, että aine on tehokas apu bakteereja vastaan, ja tämän havainnon myötä klooriheksidiiniä alettiin käyttää hammaslääketieteellisiin tarkoituksiin. [6, s.1049.]

Klooriheksidiini on tänä päivänä tunnetuin antiseptinen aine. Se tuhoaa tehokkaasti useimpia Gram-positiivisia ja joitakin Gram-negatiivisia bakteereja. Itiöitä se ei pysty tuhoamaan. Klooriheksidiiniä käytetään pääosin ehkäisemään ja hoitamaan ihon punoitusta ja turvotusta. Lisäksi sillä helpotetaan ientulehdukseen liittyvää verenvuotoa. Eläinlääketieteessä klooriheksidiiniä käytetään paljon ihon ja haavojen desinfiointiin sekä hoitovälineiden puhdistukseen. Antiseptisten ominaisuuksiensa ja myrkyttömyytensä vuoksi sitä käytetään myös monissa arkipäivän tuotteissa. Esimerkiksi shampoot, voiteet ja ihonpuhdistustuotteet sisältävät klooriheksidiiniä. [7.]

Koska klooriheksidiini on voimakkaasti emäksinen aine, sitä käytetään etupäässä neutraaleina suoloina: glukonaattina, asetaattina tai hydrokloridina. Glukonaattisuola on kaikista helppoliukoisin. [6, s. 1049.]

Euroopassa ja Japanissa klooriheksidiinin suoloja käytetään paljon farmaseuttisiin tarkoituksiin niiden antimikrobiologisten ominaisuuksien vuoksi. Klooriheksidiinin suolat tuhoavat klooriheksidiinin tavoin bakteereja. Lisäksi ne vaikuttavat myös joihinkin lipofiilisiin viruksiin, esimerkiksi adeno-, herpes- ja influenssaviruksiin. Pääasiassa klooriheksidiinin suoloja käytetään desinfiointitarkoituksiin, mutta niitä on käytetty myös säilöntäaineina. Esimerkiksi klooriheksidiinin asetaatti- ja glukonaattisuoloja käytetään silmätippojen säilöntäaineena. Klooriheksidiinin suoloja löytyy muun muassa antiseptisistä voiteista ja hammastahnoista. Niitä voidaan käyttää myös katetrin sterilointiin ja virtsarakon huuhtelemiseen. [8, s. 136 - 137.]

molekyyli on stabiili silloin kun säilytysolosuhteet ovat sopivat. Ei estää säilyttämällä sitä viileässä ja valolta suojattuna. Aine hajoaa hitaasti ultraviolettisäteiden vaikutuksesta. Muutaman tunnin altistuksella normaalille huoneenvalolle ei ole merkitystä. Hajotessaan klooriheksiidiini hajoaa parakloorianiliiniksi, joka on toksinen aine. [6, s. 1049.]

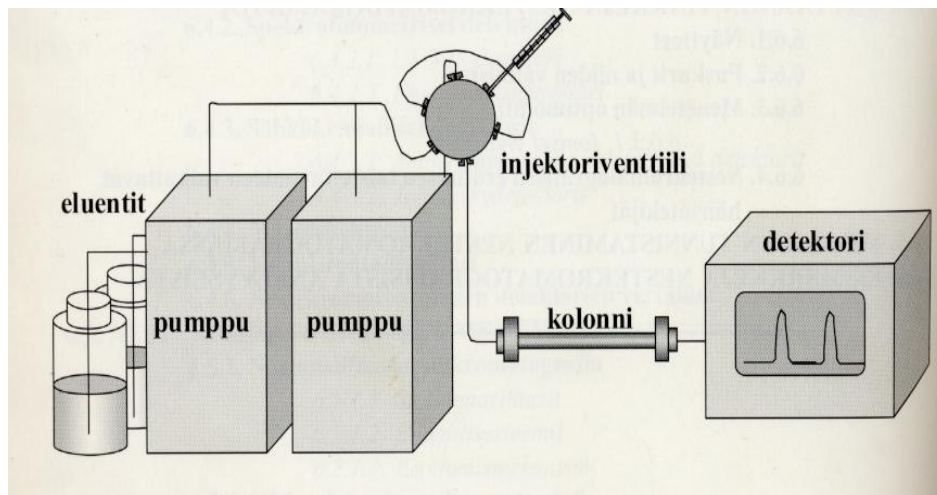
Klooriheksidiinisulolat ovat hyvin stabiileja, kun ne ovat huoneenlämmössä ja kiinteässä muodossa. Kuumentaminen 150 °C:seen aiheuttaa klooriheksidiinin ja sen suolojen erottumisen, jolloin hajoamistuotteena muodostuu parakloorianiliinia. Klooriheksidiinin eri suolojen välillä on kuitenkin eroavaisuuksia. Esimerkiksi klooriheksidiinihydrokloridi kestää paremmin lämpöä kuin klooriheksidiiniasetaatti. Vesiliuoksissa klooriheksidiinin sulolat muodostavat hydrolyysin kautta parakloorianiliinia. On tutkittu, että hydrolyysi nopeutuu merkittävästi 100 °C:n jälkeen. Hydrolyysi nopeutuu myös silloin, kun pH laskee alle 5,6 tai nousee yli 5,6. [8, s. 138.]

### 3.4 HPLC

HPLC, eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia, kehitettiin 1960-luvulla. Melko pian kehittämisen jälkeen HPLC otettiin käyttöön lääketeollisuudessa. HPLC-laitteet ovat kehittyneet koko ajan paremmiksi, ja nykyään HPLC-menetelmistä on tullut hyvin lääketeollisuuteen sopivia ja siellä paljon käytettyjä analyysimenetelmiä. Menetelmät ovat tuoneet mukanaan nopeita ja monipuolisia erotusmahdollisuuksia. Farmaseuttisten valmisteiden ja raaka-aineiden puhtausvaatimukset ovat kasvaneet koko ajan, ja HPLC-menetelmät ovat mahdollistaneet puhtauden tutkimisen vaatimusten mukaisella tarkkuudella. Lääkeaineiden tutkiminen onnistuu HPLC-menetelmien myötä myös biologisista- ja ympäristönäytteistä. Uudet menetelmät ovat antaneet paljon uusia vaihtoehtoja erotusongelmien selvittämiseen. Näitä menetelmiä voidaan pitää tärkeimpinä analyttisinä menetelminä nykyajan farmaseuttisissa analyyseissä. [9, s. 210.]

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on tekniikka, jossa yhdistetään nestekromatografian teoria ja alun perin kaasukromatografille kehitetty laitteisto. Normaali nestekromatografia on kehitetty kauan sitten, ja sen eri muodot ovat olleet käytössä pitkään. [10, s. 1.]

...enne  
...grafiassa liikkuvana faasina on neste ja stationäärifaasina kiinteä faasi. Ainoa vaatimus näytteelle on se, että se liukenee johonkin liuottimeen. Laitteisto (kuva 1) koostuu eluenttipulloista, pumpuista, injektorista, kolonnista ja detektorista. [11, s. 136.]



Kuva 1. HPLC-laitteiston kaaviokuva [11, s. 136]

Pumput pumppaavat eluenttia korkealla paineella ja tietyllä virtausnopeudella kolonnin läpi. Näytettä injektoidaan, jolloin eluentti kulkee injektorin läpi ja kuljettaa näytteen mukanaan kolonniin. Erottumisen aiheuttavat näytekomponenttien erilaiset vuorovaikutukset stationäärifaasin ja eluentin välillä. Erottuneet komponentit havaitaan detektorin avulla. Kolonnin ja eluentin lämpötiloja voidaan myös muuttaa kolonniuunin avulla. Lämpötilaa säätämällä voidaan esimerkiksi parantaa toistettavuutta ja lyhentää analyysiaikoja. Laitteiston ohjaus tapahtuu yleensä tietokoneen avulla. [11, s. 136 - 137; 12, s. 634.]

in stationäärifaasin ja näytteen koostumuksen mukaan. Sen koostumus optimoidaan kokeilemalla tai tarkoitukseen suunnitelluilla tietokoneohjelmilla. Muita optimointiparametrejä ovat stationäärifaasi, pH ja lämpötila. [11, s. 141 - 142.]

Tässä työssä käytetään käänteisfaasinestekromatografiaa. Käänteisfaasinestekromatografiassa stationäärifaasin ja eluentin poolisuudet ovat vastakkaiset verrattuna normaalifaasinestekromatografiaan. Normaalifaasinestekromatografiassa stationäärifaasi on polaarinen ja liikkuva faasi on vähemmän polaarinen. Käänteisfaasinestekromatografian etuja ovat stabiilimmat olosuhteet ja halvemmat eluentit. [12, s. 634; 13, s. 156.]

Asetonitriliin, metanolin, tetrahydrofuraanin ja veden tai puskuriliuoksen yhdistelmät erottavat valtavan määrän komponentteja käänteisfaasinestekromatografiassa. Menetelmää kehitettäessä ensimmäisenä kannattaa kokeilla asetonitriliä orgaanisena liuottimena. Asetonitriliin viskositeetti on pieni, minkä vuoksi paineet pysyvät ajojen aikana alhaisina. Ultraviolettivalolla detektoitaessa alhaisin käyttöaallonpituus on 190 nm, joka on alhainen verrattuna muihin orgaanisiin liuottimiin. Monella analytyillä on absorbanssimaksimi tällä aallonpituusalueella. Asetonitrili on suosituin näistä orgaanisista liuottimista, koska vesi-asetonitriliseoksella saavutetaan parempi erotustehokkuus kuin esimerkiksi vesi-metanoliseoksella. Myös kaasukuplien muodostuminen on vähäisempää. Asetonitriliin käytössä huonoja puolia ovat sen myrkyllisyys ja kalliimpi hinta. Jos asetonitrili ei ole analyysiin sopiva, seuraavaksi valitaan orgaaniseksi liuottimeksi metanoli. Metanolilla on korkeampi viskositeetti ja alhaisin käyttöaallonpituus on suuremmilla aallonpituuksilla kuin asetonitrilillä. Kolmantena vaihtoehtona kokeillaan tetrahydrofuraania. Sillä on vähiten käytettävää UV-aluetta, se on hitaasti hapettuva ja se tasapainottuu hitaammin stationäärifaasin kanssa. [11, s. 142; 12, s. 614, 628.]

grafin kolonnit ovat kalliita ja helposti tukkeutuvia. Tämän vuoksi kolonnien suojaamiseksi ja käyttöiän pidentämiseksi on kehitetty esikolonnit. Esikolonne kerää näytteen alkupäähän jäävät näytteen sisältämät liukenemattomat ja eluoitumattomat komponentit. Esikolonnit ovat yleensä lyhyitä ja sisältävät analyttisen kolonnin kanssa samaa tai samankaltaista täyttemateriaalia. [10, s. 152; 13, s. 146.]

Esikolonnien käytössä ongelmana on se, että ne lisäävät vyöhykelevenemistä. Jos vyöhykeleveneminen häiritsee analyysiä, voidaan esikolonnin tilalla käyttää pientä suojakolonnia. [10, s. 152; 13, s. 146.]

#### 3.4.4 Kolonne

Kolonne on yleensä ruostumatonta terästä tai teräsputkeen asennettu lasiputki, joka on pakattu sopivalla stationäärifaasilla. Kolonnin on kestävä hyvin korkeita paineita, sen on oltava kemiallisesti inertti ja sen sisäpinnan on oltava hyvin sileä. Lisäksi tyhjän tilavuuden on oltava mahdollisimman pieni. [10, s. 144.]

Kolonnin pituus vaihtelee muutamasta sentistä kymmeneen senttiin. Lyhyillä kolonneilla erottuminen saadaan nopeammaksi ja pidemmät kolonnit aiheuttavat suuremman vastapaineen. Suurta vastapainetta aiheuttavat lisäksi pieni sisähalkaisija sekä pienillä stationäärifaasipartikkeleilla pakatut kolonnit. [10, s.144.]

Kolonnit on pakattu kiinteillä stationäärifaasipartikkeleilla. Stationäärifaasipartikkelit voivat olla pyöreitä, epäsäännöllisiä tai tankomaisia ja kooltaan ne voivat olla makrokokoisia (16 - 40  $\mu\text{m}$ ), keskikokoisia (5 - 15  $\mu\text{m}$ ) tai mikrokokoisia (1,5 - 4  $\mu\text{m}$ ). Pakkausmateriaali on rakenteeltaan ei-huokoinen, pellikulaarinen, huokoinen tai täysin huokoinen. [10, s. 144 - 145.]



on paljon eroja ja ne erottavat eri tavalla erilaisia yhdisteitä. Kolonnien täytyy olla helposti vaihdettavissa. Menetelmän kehityksessä työ kannattaa aloittaa kolonnilla, jolla on hyvä teoreettinen pohjaluku ja kyky erottaa mahdollisimman paljon erilaisia yhdisteitä. Kun kolonni on valittu, on suositeltavaa, että erotusongelmia kohdatessa etsitään niihin ratkaisua ensimmäiseksi muista tekijöistä. Muita tekijöitä ovat esimerkiksi ajoliuos, lämpötila ja pH. Jos muista tekijöistä ei löydy ratkaisua, vaihdetaan toinen kolonni. Tähän suositukseen on syynä kolonnien kalleus. Muiden tekijöiden muuttaminen tulee halvemmaksi kuin uusien kolonnien hankkiminen. Kun aloitetaan uuden menetelmän kehitys, suositellaan ensimmäisiksi kolonneiksi C8- tai C18-kolonnia. Näillä kolonneilla on riittävän hyvä teoreettinen pohjaluku. [14.]

## 4 TYÖN TOTEUTUS

Työ aloitettiin menetelmän kehityksellä. Klooriheksidiini oli uutettava vesirokkovoiteesta analysoitavaan muotoon, jonka jälkeen oli kehitettävä sopiva HPLC-menetelmä klooriheksidiinin analysoimiseksi. Menetelmän piti myös kyetä erottamaan klooriheksidiini- ja p-kloorianiliinipiikit toisistaan.

### 4.1 Uuttoliuoksen etsiminen

Menetelmän luominen aloitettiin Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis -lehdessä olleen menetelmän pohjalta [7].

Näytematriisina voide oli hankala. Ongelmana oli, miten näyte saataisiin sellaiseen muotoon, että rasva ei häiritsisi analyysiä. Menetelmässä oli mainittu yksi mahdollinen näytteenkäsittely klooriheksidiiniä sisältävälle voiteelle. Tämän näytteenkäsittelyn toimivuudesta vesirokkovoiteessa ei kuitenkaan ollut varmuutta, joten haluttiin kokeilla lisäksi muita uuttoliuoksia. Uuttoliuoksiksi valittiin orgaanisista liuottimista asetonitrili, metanoli ja propanoli. Edellä mainitun menetelmän mukaisessa näytteenkäsittelyssä uuttoliuoksena oli asetonitriliin ja 1 % muurahaishapon seos. Orgaanisten liuottimien ollessa uuttoliuoksina näytteenkäsittely oli seuraavanlainen:



ttiin 0,313 g, 0,625 g ja 1,250 g 50 ml:n mittapulloihin. Näytet-  
määriä ja näytteen määrää vaihdeltiin menetelmänkehityksen  
aikana, koska ei tiedetty, minkälaisia vasteita milläkin näyttemäärällä saatiin.  
Lisättiin 30 ml orgaanista liuotinta ja pidettiin ultraäänihauteessa 20 minuut-  
tia. Sekoitettiin tasoravistelijalla 20 minuuttia ja täytettiin merkkiin liuottimella.

Asetonitriliin ollessa liuottimena liuokset jäivät sameiksi ja paakkuisiksi. Me-  
tanoli teki liuoksista paakuttomia ja lähes kirkkaita ja propanoli-liuokset olivat  
paakuttomia ja sameita. Näytteet suodatettiin vesi- ja orgaanisille liuoksille  
sopivilla 0,45 µm:n PTFE-ruiskusuodattimilla injektiopulloihin.

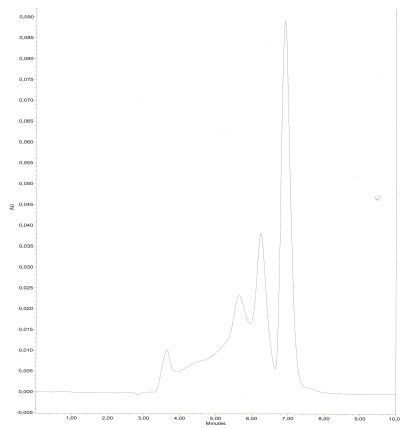
Menetelmän mukaisessa näytteenkäsittelyssä punnittiin 0,125 g, 0,250 g ja  
0,500 g näytettä sentrifuugiputkiin. Valmistettiin liuotin, jossa oli asetonitriliä  
ja 1 % muurahaishappoa suhteessa 20:80. Sentrifuugiputkiin lisättiin 20 ml  
valmistettua liuotinta ja niitä pidettiin vesihauteessa 80 °C:ssa 20 minuuttia.  
Sentrifugoitiin 20 minuuttia 4000 rpm:llä. Syntyi samea liuos, jonka pinnalla  
oli valkea levymäinen sakka. Supernatanttia suodatettiin 0,45 µm:n suodat-  
timella injektiopulloihin.

Näytteet injektioitiin menetelmän mukaisissa ajo-olosuhteissa:

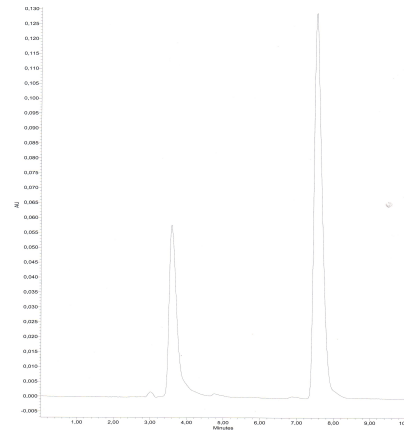
- Ajoliuos: 35 % ACN  
65 % Fosfaattipuskuri, pH 3
- Virtaus: 0,6 ml/min
- Ajoaika: 10 min
- Detektointi: 239 nm.

Menetelmässä ei mainittu injektioilavuutta, joten injektioilavuudeksi kokeil-  
tiin 10 µl:aa. Kolonniksi valittiin XTerra Phenyl 3,5 µm 4,6 x 150 mm kolonni,  
koska edellä esitetystä menetelmästä oli käytetty fenyyli-kolonnia.

otiin ja tarkasteltiin näytteiden kromatogrammeja. Tarkasteltiin olevaa näytettä, jonka kromatogrammi löytyy kuvasta 2. Piikit eivät erottuneet toisistaan. Liuotinpiikki ja näytteestä tulevat piikit olivat kaikki yhdessä ja kiinni toisissaan. Tämä johtui luultavasti siitä, että ajoliuoksessa oli asetonitriiliä, jonka vuoksi laite ei kyennyt erottamaan ajoliuosta ja näytettä toisistaan. Edellä mainitun menetelmän mukaisessa näytteenkäsittelyssä piikit eivät erottuneet toisistaan (kuva 3).

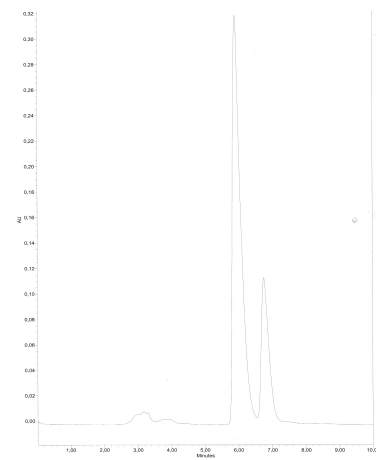


Kuva 2. Asetonitriili liuottimena

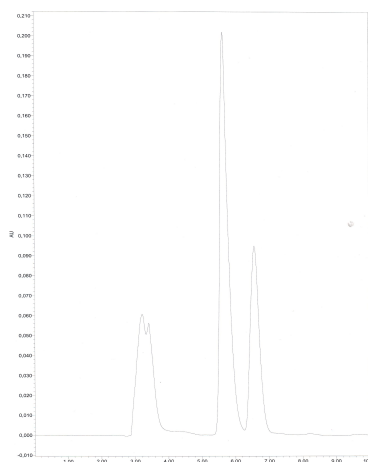


Kuva 3. Menetelmän mukainen  
näytteenkäsittely

Metanolin ja propanolin ollessa liuottimina, näytteen kromatogrammiin erottui kaksi piikkiä (kuvat 4 ja 5). Piikit olivat kuitenkin lähellä toisiaan.



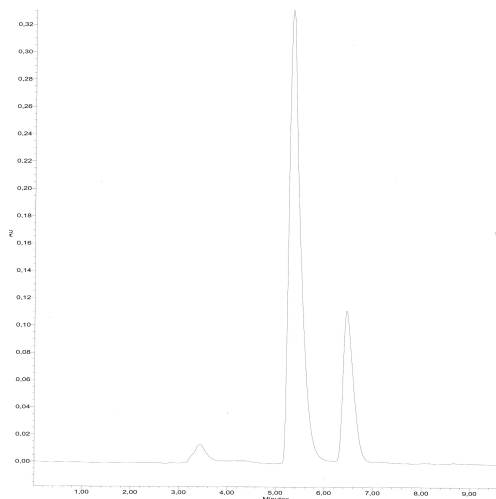
Kuva 4. Metanoli liuottimena



Kuva 5. Propanoli liuottimena

...ukainen näytteenkäsittely hylättiin, koska se ei erottanut piik-  
... . Jatkettiin orgaanisiin liuottimiin uuttamista ja otettiin näyt-  
teenkäsittelyyn mukaan vesi. Näytettä punnittiin 50 ml:n mittapulloihin 1,25 g  
ja 1,88 g. Lisättiin 25 ml orgaanista liuotinta, jota oli laimennettu vedellä suh-  
teessa 50:50, ja pidettiin ultraäänihauteessa 20 minuuttia. Sekoitettiin taso-  
ravistelijalla 20 minuuttia ja täytettiin mittapullot merkkiin samalla liuottimella.  
Asetonitrilissä ja metanolissa olevat näytteet jäivät sameiksi ja paakkuisiksi,  
eikä niiden suodatus onnistunut liuosten paksuuden vuoksi. Valmistettiin uu-  
det näytteet, joissa näytteet uutettiin ensin 25 ml:aan pelkkää liuotinta. Pidet-  
tiin ultraäänihauteessa 20 minuuttia. Sekoitettiin tasoravistelijalla 20 minuut-  
tia ja täytettiin merkkiin vedellä. Veden lisäyksen jälkeen liuokset menivät  
sameiksi ja niihin muodostui hyytelömäinen, paakkuinen, valkea sakka. Ase-  
tonitriili ja metanoli vesirokkovoiteen uuttoliuksena hylättiin. Propanolin ja  
veden yhdistelmä toimi hyvin. Liuoksesta tuli paakuton ja hieman samea.  
Suodatettiin 0,45 µm:n suodattimella ja injektioitiin.

Veden lisääminen näytteenkäsittelyyn paransi tuloksia. Kun näyte uutettiin  
propanoliin ja laimennettiin vedellä, piikeistä tuli parempia ja terävämpiä (ku-  
va 6). Myös liuotinpiikki näytti selkeämmältä.



Kuva 6. Liuottimena vesi-propanoli . seos

Koska propanoli uuttoliuksena oli analyysiin sopiva, ei muita orgaanisia  
liuottimia enää kokeiltu.

## ja tunnistaminen

valinnan jälkeen tarkasteltiin näytteen kromatogrammia. Havaittiin, että klooriheksidiinipiikin jälkeen kromatogrammiin erottui toinen pienempi piikki. Seuraavaksi tutkittiin, johtuiko tämä piikki voidepohjassa olevista muista vaikuttavista- tai säilöntäaineista.

Tutkimuksia varten oli valmistettu plasebo-voidetta, joka oli tehty kuten normaali vesirokkovoide, mutta siitä oli jätetty pois klooriheksidiinidiglukonaatti. Punnittiin 1,25 g plasebo-voidetta 50 ml:n mittapulloon. Lisättiin 25 ml propanolia ja näyte käsiteltiin kuten edellä. Klooriheksidiinipiikin kohdalle ei tullut piikkiä ja jälkimmäinen piikki tuli ulos. Näytteen kromatogrammiin tuleva ylimääräinen piikki johtui näin ollen voidepohjassa olevista muista aineista. Vesirokkovoiteessa käytetään säilöntäaineena metyyli parahydroksybentsoaattia. Tutkittiin, johtuiko ylimääräinen piikki tästä säilöntäaineesta.

Tehtiin liuokset, jotka sisälsivät noin 2 mg, 5 mg ja 10 mg metyyli parahydroksybentsoaattia 50 ml:ssa vesi-propanoli-liuosta. Liuokset suodatettiin ja injektioitiin. Liuosten antamat piikit tulivat ulos samalla retentioajalla kuin plasebo-voiteen kromatogrammissa ollut vieras piikki. Toisen piikin näytteen kromatogrammiin aiheutti siis säilöntäaineena käytetty metyyli parahydroksybentsoaatti.

Kirjallisuuden mukaan klooriheksidiini hajoaa p-kloorianiliiniksi. Seuraavaksi tutkittiin, erottuuko p-kloorianiliinipiikki kehitetyllä menetelmällä. Valmistettiin näyteliuos, joka sisälsi klooriheksidiiniä, metyyli parahydroksybentsoaattia ja p-kloorianiliinia vesi-propanoli-seoksessa.

SEC chromatogram of poly(2-vinylpyridine) in THF. The x-axis represents elution volume in ml, ranging from 0 to 10. The y-axis represents detector response, ranging from 0.000 to 0.235. The chromatogram shows a small peak at approximately 3.5 ml, a very large peak at approximately 4.5 ml, and two smaller peaks at approximately 6.5 ml and 7.5 ml.

Menetelmä oli toimiva, mutta sitä haluttiin kehittää piikkien muodon parantamiseksi.

Luodulle menetelmälle päätettiin tehdä kehitystyötä piikkien muodon parantamiseksi. Tiedettiin, että esikolonne aiheuttaa vyöhykelevenemistä. Tämän vuoksi piikkien muodon parantaminen aloitettiin esikolonnin poistamisesta. Piikit tulivat ulos aikaisemmin, mutta niiden muoto ja häntivyyys säilyivät. Esikolonnia ei laitettu enää takaisin.

Seuraavaksi muutettiin ajoliuosten suhteita. Kun asetonitriliin määrää nostettiin viisi prosenttia (40:60), klooriheksidiinipiikki alkoi hajota. Valmistettiin näyte plasebo-voiteesta ja injektointiin. Klooriheksidiinipiikin kohdalle ei tullut piikkiä. Näin saatiin varmistettua, että piikin hajoamisen syynä ei ollut klooriheksidiinipiikin alta esiin tuleva toinen piikki. Seuraavaksi lisättiin puskurin määrää viisi prosenttia (30:70) ja nostettiin virtausta 0,8 ml/min. Klooriheksidiinipiikki oli kauniimpi ja pysyi hajoamattomana, mutta metyyliiparahydroksybensoaatti- ja p-kloorianiliinipiikit menivät yhteen. Ajoliuossuhteiden muuttaminen ei parantanut menetelmää.

Vaihdettiin puskuriliuoksen tilalle happamampi 0,1 % TFA-liuos (trifluoroetikkahappo). Tällä tavalla selvitettiin, miten klooriheksidiini käyttäytyi happamammissa olosuhteissa. Puskuriliuoksen tilalle valittiin TFA-liuos, koska sitä oli ehdotettu käytettäväksi alhaisella pH-alueella Watersin XTerra-kolonniin

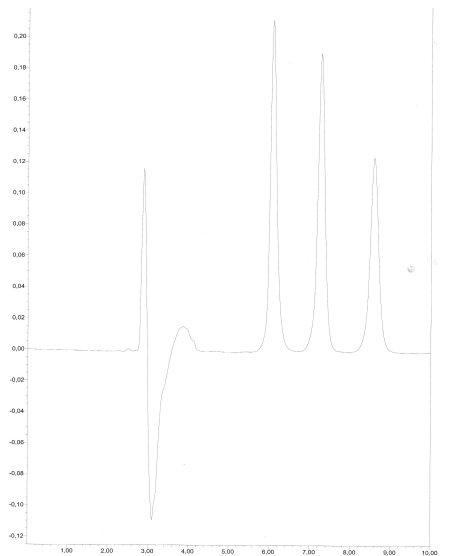
Virtaus laskettiin takaisin 0,6 ml/min ja ajoliuossuhteiksi laitettiin suhteet (35:65). Kolmas piikki ei erottunut. Asetonitriliin määrää pienennettiin viisi prosenttia (30:70), jolloin piikkien ulkonäkö parani, mutta kolmas piikki ei edelleenkään erottunut. Nostettiin virtausnopeutta 0,8 ml/min ja pienennettiin injektio-tilavuutta 5 µl:aan, mutta tulos pysyi samana. Kun asetonitriliin määrää pienennettiin viisi prosenttia lisää (25:75) ja virtausnopeus oli 0,8 ml/min, ei piikkejä erottunut enää kuin yksi.

Kaikille tutkittaville aineille valmistettiin omat näyteliuokset ja injektioitiin. Huomattiin, että klooriheksidiini- ja metyyli parahydroksybentsoaattipiikit tulivat ulos kolonnista samaan aikaan. 0,1 % TFA-liuoksen käyttö puskurin tilalla hylättiin, koska hyviä tuloksia ei saatu aikaan.

Vaihdettiin alussa käytetty fosfaattipuskuri ammoniumasetaatipuskuriksi. Tämä puskuriliuos mainittiin kolonniesittelijän mainoksessa, jossa analysoitavana esimerkkiaineena oli klooriheksidiini. pH pidettiin kolmessa, koska monissa kirjallisuudessa esitetyissä klooriheksidiinin HPLC-menetelmissä pH oli kolme, ja edellä havaittiin menetelmän toimimattomuus happamammissa olosuhteissa. Injektoitiin edellä valmistettua näytettä, joka sisälsi kaikki ainesosat, jotka haluttiin erottaa menetelmällä. Ajo-olosuhteet pidettiin muuten samoina kuin alkuperäisessä menetelmässä. Saatiin kaksi osittain toisissaan kiinni olevaa piikkiä. Puskurin osuutta ajoliuoksessa kasvatettiin viisi prosenttia (30:70). Erottui kaksi Gaussin käyrän muotoista, symmetristä piikkiä. Kolmatta piikkiä ei löytynyt, vaikka sitä etsittiin kasvattamalla ajo-aikaa. Injektoitiin näytettä, jossa oli p-kloorianiliinia vesi-propanoli-liuoksessa. Havaittiin, että p-kloorianiliinin piikki tulee ulos yhtä aikaa klooriheksidiinipiikin kanssa. Asetonitriliin määrää ajoliuoksessa kasvatettiin viidellä prosentilla (40:60). Kaikki kolme piikkiä erottuivat, mutta ne olivat liian lähellä liuotinpäikkiä. Virtausnopeuden laskeminen 0,5 ml/min siirsi kaikkia piikkejä samassa suhteessa eteenpäin.

Koska monia eri variaatioita oli testattu tällä kolonnilla, oli aika vaihtaa kolonnia. Vaihdettiin tähän asti käytetty fenyyli-kolonne C18-kolonniksi. Ajoliuossuhteet olivat ensin 40:60. Virtaus oli 0,6 ml/min ja injektio-tilavuus 10 µl. Yksi piikeistä tuli ulos yhtä aikaa liuotinpäikin kanssa ja kaksi muuta piikkiä erottuivat hyvin toisistaan. Lisättiin puskurin määrää viidellä prosentilla (35:65). Kromatogrammiin erottui kolme piikkiä, ne olivat sopivan etäisyyden

piikistä ja piikit olivat kauniita (kuva 8). Validointi suoritettiin tällä.



Kuva 8. Näytteen kromatogrammi

Lopuksi injektoidiin liuoksia, joissa oli kussakin yhtä tutkittavaa ainetta kerrallaan. Näin saatiin tunnistettua ulos tulevat piikit. Klooriheksidiiniপিিকি tuli ulos retentioajalla 6,1, metyyli parahydroksybentsoatti retentioajalla 7,3 ja p-kloorianiliini retentioajalla 8,6.

#### 4.4 Menetelmän testaus vesirokkovoiteella

Valmistettiin näytteet vesirokkovoiteesta. Eri määriä vesirokkovoidetta punnittiin 50 ml:n mittapuloihin ja näytteet uutettiin 25 ml:aan propanolia pitämällä niitä ultraäänihauhteessa 15 minuuttia. Sekoitettiin tasoravistelijalla 10 minuuttia ja täytettiin merkkiin vedellä. Lopuksi näytteet suodatettiin 0,45 µm:n suodattimella ja injektoidiin.

Näytteistä erottui kaksi hyvää piikkiä, joten menetelmä oli toimiva vesirokkovoiteelle. Havaittiin, että 0,25 g näytettä antaa sopivan suuruisen piikin kromatogrammiin. 0,25 g näytettä sisälsi 12,5 mg klooriheksidiiniä. Standardisuora valmistettiin tälle pitoisuusalueelle.

#### Standardiliuosten valmistus

Laboratoriossa oli käytössä kahden pisteen standardisuora. Standardisuoran oikeellisuus varmistettiin tarkistusstandardi C:llä, joka asettuu pisteiden A ja B väliin. Seuraavana on esitelty standardiliuosten valmistus.

Standardiliuokset valmistettiin kahdesta rinnakkaisesta kantaliuoksesta. Kantaliuokset, pitoisuudeltaan 1mg/ml, valmistettiin punnitsemalla 100 mg klooriheksidiiniä 100 ml:n mittapulloihin. Mittapullot täytettiin merkkiin 50:50 vesi-propanoli-seoksella. Kantaliuoksesta 1 valmistettiin standardit A ja B ja kantaliuoksesta 2 valmistettiin tarkistusstandardi C. Standardiliuosten valmistus tapahtui seuraavasti:

- Standardi A: 2 ml kantaliuosta 1 pipetoitiin 10 ml:n mittapulloon. Täytettiin merkkiin vesi-propanoli-seoksella. (Pitoisuus 0,20 mg/g)
- Standardi B: 3 ml kantaliuosta 1 pipetoitiin 10 ml:n mittapulloon. Täytettiin merkkiin vesi-propanoli-seoksella. (Pitoisuus 0,30 mg/g)
- Standardi C: 5 ml kantaliuosta 2 pipetoitiin 20 ml:n mittapulloon. Täytettiin merkkiin vesi-propanoli-seoksella. (Pitoisuus 0,25 mg/g)

Standardiliuokset suodatettiin 0,45  $\mu\text{m}$ :n suodattimella. Kun näytteitä injektioitiin ja tarkasteltiin kalibrointisuoraa vastaan, havaittiin, että näytteen pitoisuudeksi saatiin oikeanlaisia tuloksia. Tehtiin uusi analyysiohje Professorin vesirokkovoiteen analysoimiseksi. Analyysiohje on opinnäytetyön liitteenä 1.



## RIEN TEORIAA

Kun menetelmänkehitys oli valmis, uusi menetelmä validoitiin. Validoimalla menetelmä todistettiin, että se soveltui käyttötarkoitukseensa ja antoi luotettavia tuloksia. Validoinnissa tuli käyttää pitoisuudeltaan varmennettuja vertailumateriaaleja. [11, s. 313.]

Tässä työssä vertailumateriaalina oli voiteen valmistuksessa käytettävä kloorihexidiinidiglukonaatti-liuos. Ennen menetelmän kehityksen aloittamista määritettiin tämän liuoksen käyttöpitoisuus ja käyttökelpoisuus Ph.Eur:n (European Pharmacopeia) menetelmän mukaan. Liuos määritettiin näin In-house-standardiksi. Liuos oli käyttökelpoista ja käyttöpitoisuus otettiin huomioon mittausten käsittelyssä.

Laboratoriossa tehtävät validoinnit perustuvat ICH:n (International Conference on Harmonisation) validointiohjeisiin [15]. Myös tämä menetelmä validoitiin näiden ohjeiden mukaan.

Validoinnissa tutkittavia parametreja olivat

- Systeemin soveltuvuus
- Lineaarisuus
- Oikeellisuus
- Toistettavuus
- Spesifisyys
- Haavoittuvuus
- Määritysalue.

Seuraavaksi on kerrottu, mitä tutkittavilla validointiparametreilla tarkoitettiin ja miten ne oli tämän menetelmän validoinnissa tutkittu. Ajoissa käytettiin samaa standardisuoraa. Joka päivä tehtiin uusi tarkistusstandardi C, jonka suoralta mitattu arvo sai poiketa enintään 2,0 % teoreettisesta arvosta.

us  
soveltuvuustestissä osoitettiin laitteiston toimintakunto. Soveltuvuustestin oli oltava voimassa validointikokeiden aikana. Tämän vuoksi soveltuvuustesti oli tehtävä aina kolonnin pesun ja muiden keskeytysten jälkeen.

Systeemin soveltuvuus testattiin injektoimalla viisi kertaa 100 % standardiliuosta. RSD-vaatimus injektioinneille oli  $m2,0$  %. Viimeisestä injektioinnista määritettiin kapasiteettitekijä (k), häntimistekijä (T) ja pohjaluku (N). Vaatimukset näille kromatografisille parametreille olivat

- k:  $\geq 1$
- T:  $0,8 \leq 1,5$
- N:  $> 2000$ .

## 5.2 Lineaarisuus

Lineaarisuudella varmistettiin, että menetelmän piikkien pinta-alat olivat käytettävän detektorin lineaarisuusalueella. Lineaarisuutta tutkittiin viidellä standardiliuksella ja viidellä näyteliuksella, joiden pitoisuudet vaihtelivat välillä 60 - 140 % tavoitepitoisuudesta.

Lineaarisuusnäytteitä varten valmistettiin 1 mg/ml kantaliuos liitteessä 1 olevan analyysiohjeen mukaisesti. Kantaliuoksesta tehtiin taulukon 1 mukaiset laimennokset.

Taulukko 1. Kantaliuoksesta tehdyt laimennokset

	Kantaliuos	Vesi:propanoli	Pitoisuus
60 %	3 ml	ad 20 ml	0,15 mg/ml
80 %	4 ml	ad 20 ml	0,20 mg/ml
100 %	5 ml	ad 20 ml	0,25 mg/ml
120 %	6 ml	ad 20 ml	0,30 mg/ml
140 %	7 ml	ad 20 ml	0,35 mg/ml

on 2 mukaiset laimennokset standardiliuoksesta ja plasebo-

*Taulukko 2. Standardiliuoksesta ja plasebo-voiteesta tehdyt laimennokset*

	Kantaliuos	Plasebovoide	Vesi:propanoli	Pitoisuus
60 %	3 ml	0,25 g	ad 20 ml	0,15 mg/ml
80 %	4 ml	0,25 g	ad 20 ml	0,20 mg/ml
100 %	5 ml	0,25 g	ad 20 ml	0,25 mg/ml
120 %	6 ml	0,25 g	ad 20 ml	0,30 mg/ml
140 %	7 ml	0,25 g	ad 20 ml	0,35 mg/ml

Jokaisesta liuoksesta tehtiin yksi injektointi. Tuloksista piirrettiin lineaarisuuskuvaaja ja laskettiin korrelaatiokerroin. Korrelaatiokertoimen oli oltava vähintään 0,99. Lisäksi suoran lineaarisuutta tarkasteltiin residuaalikuvaajan avulla.

### 5.3 Oikeellisuus

Oikeellisuudella selvitetään, miten lähellä oikeaa tulosta menetelmän antamat tulokset ovat. Oikeellisuus voidaan selvittää referenssimateriaalien avulla, vertaamalla kahta tai useampaa analyysimenetelmää, analysoimalla nollanäytettä, johon on lisätty tunnettu määrä tutkittavaa ainetta tai analysoimalla oikeaa näytettä, johon on lisätty tunnettu määrä tutkittavaa ainetta. Näistä käytetyin menetelmä on nollanäytteiden avulla tehdyt saantokokeet. Vertailumateriaalien käyttö on vähäisempää, koska yleensä niitä ei ole saatavissa. Myöskään toista analyysimenetelmää ei välttämättä ole käytettävissä. Saantokokeet tehdään näytteillä, jos nollanäytettä ei ole saatavilla. [12, s. 725.]

Oikeellisuuden avulla selvitettiin mahdollisten systemaattisten virheiden olemassaoloa. Tässä validoinnissa oikeellisuuskokeissa selvitettiin lääkeaineen uuttumista taustamatriisista saantoprosenttien avulla, sekä saannon riippuvuus konsentraatiosta. Oikeellisuus määritettiin analyysimenetelmän määritysalueella ja tuloksista laskettiin saantoprosentit ja niiden keskiarvot sekä keskihajonnat ja luottamusväli.

Oikeellisuuskokeet suoritettiin kolmella konsentraatitasolla, jotka olivat noin 60 %, 100 % ja 140 % tavoitepitoisuudesta. Jokaisesta tasosta valmistettiin

ista näytettä. Kaikkiin mittapulloihin punnittiin tunnettu määrä  
etta ja voidepohjaa. Tulokset ilmoitettiin saantoprosentteina.

Oikeellisuuskokeisiin valmistettiin kantaliuos punnitsemalla 125 mg kloori-  
heksidiinin In-house-standardia 100 ml:n mittapulloon ja laimentamalla se  
vedellä merkkiin. Kantaliuoksesta tehtiin laimennokset pipetoimalla 6 ml, 10  
ml ja 14 ml kantaliuosta 50 ml:n mittapulloihin. Pulloihin lisättiin 0,25 g pla-  
sebo-voidetta ja 25 ml propanolia. Analyysiohjeen mukaisen näytteenkäsitte-  
lyn jälkeen mittapullot täytettiin merkkiin vedellä. Näytteet suodatettiin ja in-  
jektoitiin ja tuloksista laskettiin saantoprosentit.

Saantoprosenttien tuli olla 90,0 - 110,0 % rajoissa. Tuloksista laskettiin myös  
RSD, jonka tuli olla pienempi kuin 2,0 %.

#### 5.4 Toistettavuus

Toistettavuus jakaantui menetelmän toistettavuuden ja laboratorion sisäisen  
uusittavuuden tutkimiseen.

Menetelmän toistettavuus ilmaisee tulosten hajonnan, kun määritykset teh-  
dään samasta homogeenisesta näytteestä. Tulokset saatiin laskettua oikeel-  
lisuus-kokeiden tuloksista. Tuloksista laskettiin keskiarvo, SD, RSD sekä 95  
% luottamusväli.

Laboratorion sisäinen uusittavuus tutkittiin kuudesta rinnakkaisesta näyteliu-  
oksesta kolmena eri päivänä. Jokaisella kerralla valmistettiin uudet standar-  
di- ja näyteliuokset. Tuloksia verrattiin varianssianalyysillä. Varianssianalyy-  
sin avulla selvitettiin, olivatko sarjojen sisäiset ja sarjojen väliset erot merkit-  
täviä 95 % luottamustasolla.

Spesifisyydessä tutkittiin, että näytteiden epäpuhtaudet, taustamatriisi tai käytettävät reagenssit eivät häirinneet analyysijä. Lisäksi käytettävän menetelmän piti erottaa klooriheksidiinin hajoamistuotteet. Tarkasteltiin myös hajoamistuotteiden näytteiden pääpiikin puhtautta.

Ajoliuoksen ja uuttoliuoksen vaikutus tutkittiin injektoimalla kumpaakin liuosta. Liuosten kromatogrammeista nähtiin, aiheuttivatko liuokset ylimääräisiä piikkejä näytteiden kromatogrammiin.

Taustan vaikutus tutkittiin injektoimalla plasebo-näytettä. Plasebo-näyte valmistettiin punnitsemalla 0,25 g voidepohjaa 50 ml:n mittapulloon. Näytteenkäsittely oli liitteessä 1 olevan analyysiohjeen mukainen.

Lisäksi valmistettiin näyte, jossa voidepohjaan oli lisätty p-kloorianiliinia ja muita mahdollisia tunnettuja hajoamistuotteita. Tällä tavalla saatiin tutkittua hajoamistuotteiden ja muiden vaikuttavien aineiden häiritsevyys analyysissä.

#### *Hajotuskokeet*

Standardiliuoksen hajoamista tutkittiin seuraamalla pääpiikin- ja hajoamistuotteiden pinta-aloja ajan funktiona emäksisissä, happamissa ja hapettavissa olosuhteissa.

Ajo-olosuhteet ja standardiliuosten valmistus olivat vesirokkovoiteen analyysiohjeen mukaiset. Hajotuslämpötilaksi valittiin 100 °C, koska kirjallisuuden mukaan merkittävä hajoaminen alkoi 100 °C:ssa.

Klooriheksidiinin In-house-standardista valmistettiin 1 mg/ml kantaliuos. Hajotuskokeet tehtiin tälle liuokselle. Seuraavana on esitetty näytteiden valmistus ja käsittely:

- 1 M Natriumhydroksidihajotus  
5,0 ml kantaliuosta pipetoitiin 20 ml:n mittapulloon ja lisättiin 5,0 ml NaOH:a. Liuokset laitettiin ilman korkkia lämpökaappiin (100 °C) 1, 2 ja 3 tunniksi. Liuokset jäähdytettiin ja neutraloitiin lisäämällä 5,0 ml 1 M suolahappoa ja täytettiin merkkiin vesi-propanoli-seoksella.

#### suolahappohajotus

Kantaliuosta pipetoitiin 20 ml:n mittapulloon ja lisättiin 5,0 ml 1 M suolahappoa. Liuokset laitettiin ilman korkkia lämpökaappiin (100 °C) 1, 2 ja 3 tunniksi. Liuokset jäähdytettiin ja neutraloitiin lisäämällä 5,0 ml 1 M NaOH:a ja täytettiin merkkiin vesi-propanoli-seoksella.

- 30 % Vetyperoksidihajotus

5,0 ml kantaliuosta pipetoitiin 20 ml:n mittapulloon ja lisättiin 5,0 ml 30 % vetyperoksidiliuosta. Pullojen suut peitettiin alumiinifoliolla ja liuokset laitettiin lämpökaappiin (100 °C) 1, 2 ja 3 tunniksi. Liuokset jäähdytettiin ja täytettiin merkkiin vedellä.

Lisäksi valmistettiin taustaliuokset, joiden avulla saatiin tunnistettua taustasta aiheutuneet piikit.

- 1) Pipetoitiin 5,0 ml 1 M natriumhydroksidia ja 5,0 ml 1 M suolahappoa 20 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin vesi-propanoli -seoksella.
- 2) Pipetoitiin 5,0 ml 30 % vetyperoksidia 20 ml:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin vesi-propanoli -seoksella.

Liuoksia injektointiin ja hajotuskoe näytteiden piikkien pinta-aloja verrattiin taustaliuosten piikkien pinta-aloihin. Pinta-alojen suhteita vertaamalla saatiin tietää, miten paljon pääpiikki oli hajonnut.

## 5.6 Menetelmän haavoittuvuus

Menetelmän haavoittuvuudessa tutkittiin pienten muutosten vaikutusta menetelmään. Tutkittavia parametrejä olivat

- Uuttoaika
- Näytteiden ja standardien säilyvyys (vaatimus  $\geq$  12 h)
- Ajoliuoksen koostumus
- Ajoliuoksen komponenttien muutos
- Ajoliuoksen pH:n muutos
- Virtausnopeus
- Injektio tilavuus.

on selvitetty, minkälaisia muutoksia haavoittuvuustutkimuksis-

*Taulukko 3. Haavoittuvuustutkimuksessa tehdyt muutokset*

	Alkuperäinen	Muutos	Muutos
Uuttoaika	15 min	10 min	20 min
Säilyvyys		1 vrk	2 vrk
Ajol. koostumus	50 mM	40 mM	60 mM
Ajol.komponenttien muutos	65:35	60:40	70:30
Ajol. pH	3.0	2.0	4.0
Virtausnopeus	0,6 ml/min	0,5 ml/min	0,7 ml/min
Injektioilavuus	10 µl	5 µl	15 µl

Muutoksien vaikutus mitattiin tunnuslukujen  $k'$ ,  $T$  ja  $N$ -arvojen muutoksilla.

Säilyvyystutkimus tehtiin valmistamalla kaksi standardi- ja näyteliuosta. Toiset liuokset säilytettiin valolta suojaamattomina ja toiset valolta suojattuina. Liuokset analysoitiin vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluttua. Tutkimus tehtiin myös säilyttämällä liuoksia näytteensyöttäjässä injektiopulloissa. Näytteet analysoitiin vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluttua.

Lisäksi tutkittiin suodatuksen vaikutus standardiliuoksissa. Injektoitiin suodattettuja ja suodattamattomia standardiliuoksia ja vertailtiin injektioitoistettavuutta, keskiarvoa ja pinta-aloja.

## 5.7 Määritysalue

Kun validoitava menetelmä oli lineaarinen, toistettava ja tarkka välillä 60 - 140 % tavoitepitoisuudesta, oli tämä väli samalla myös menetelmän määrittämisalue. Määritysalueen määrittämiseksi ei tarvinnut tehdä omia mittauksia.

## TEN KÄSITTELY

Tässä kappaleessa on esitelty validointimittausten tulokset ja tulosten käsittely.

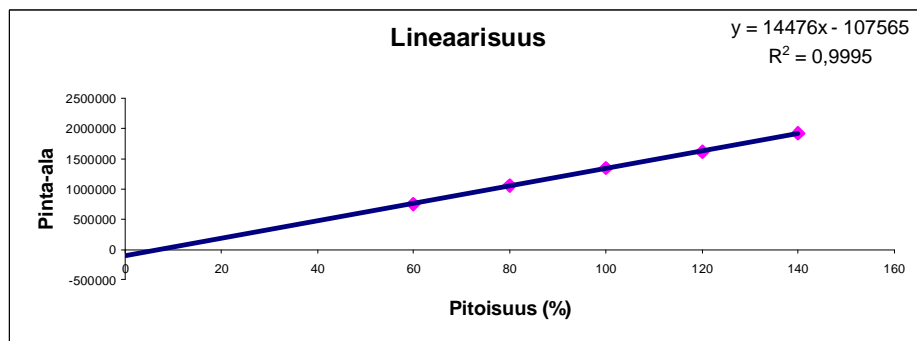
### 6.1 Lineaarisuus

Valmistettiin viisi pitoisuudeltaan 60 - 140 % standardiliuosta ja plasebonäytettä. Tarkasteltiin piikkien pinta-aloja ja laskettiin teoreettiset pinta-alat sekä residuaalit (taulukko 4).

Taulukko 4. Standardiliuosten pinta-alat, teoreettiset pinta-alat ja residuaalit

Pitoisuus-%	Pinta-ala	Teoreettinen pinta-ala	Residuaali
60	750 624,0	761023,2	-10399,2
80	1062931,0	1050552,7	12378,3
100	1347174,0	1340082,2	7091,8
120	1619890,0	1629611,7	-9721,7
140	1919792,0	1919141,2	650,8

Tulosten perusteella saatiin piirrettyä lineaarisuuskuvaaja (kuva 9).



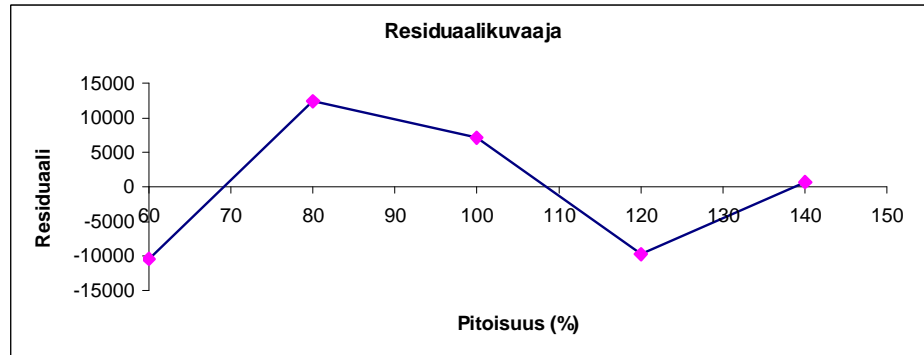
Kuva 9. Standardiliuosten lineaarisuuskuvaaja

Suoran selitysaste oli 0,9995. Laskettiin selitysasteesta suoran korrelaatiokerroin  $r$  kaavan 1 avulla.

$$r = \sqrt{R^2} \quad (1)$$



atiokertoimeksi saatiin 0,9997 ja se täytti annetun vaatimuk-  
 suora näytti lineaariselta, mutta suoran lineaarisuutta tarkastel-  
 tiin vielä residuaalien avulla. Residuaalit ovat mittaamalla saatujen ja regres-  
 siosuoralta laskettujen y-arvojen erotuksia. Laskettujen residuaalien perus-  
 teella piirrettiin residuaalikuvaaja (kuva 10).



Kuva 10. Standardiliuosten reiduaalikuvaaja

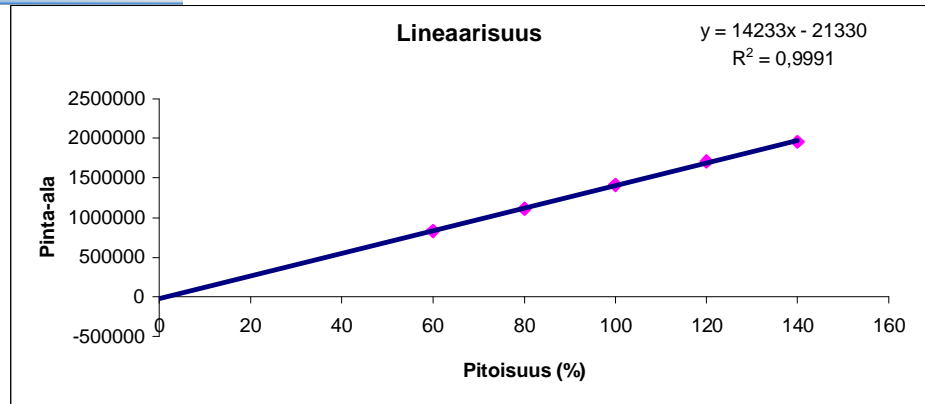
Kun suora on lineaarinen, residuaalit jakautuvat nollatason molemmin puolin.  
 Tämä toteutui, joten menetelmä oli lineaarinen standardiliuoksille pitoisuus-  
 alueella 60 . 140 %.

Näyteliuosten lineaarisuus tutkittiin samalla pitoisuusalueella. Piikkien pinta-  
 aloja tarkasteltiin ja laskettiin teoreettiset pinta-alat sekä residuaalit (taulukko  
 5).

Taulukko 5. Näytteiden piikkien pinta-alat, teoreettiset pinta-alat sekä residuaalit

Pitoisuus (%)	Pinta-ala	Teoreettinen pinta-ala	Residuaali
60	827177	832667,8	-5490,8
80	1112227	1117333,6	-5106,6
100	1411774	1401999,4	9774,6
120	1704399	1686665,2	17733,8
140	1954420	1971331,0	-16911

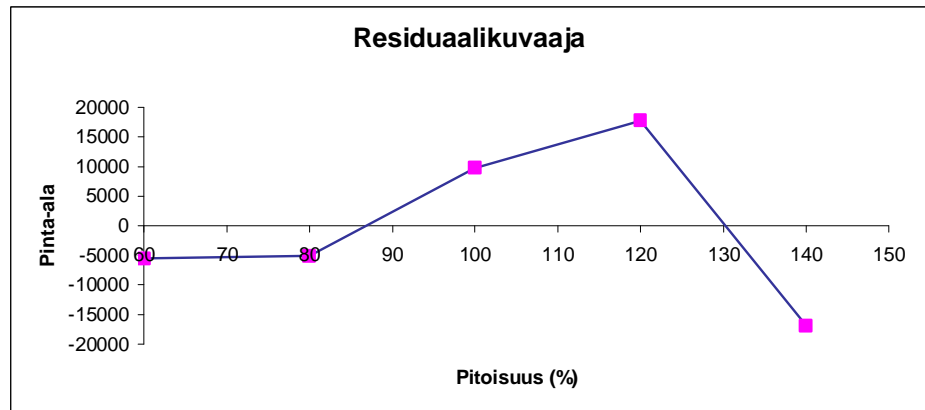
en perusteella lineaarisuuskuvaaja (kuva 11).



Kuva 11. Näyteliuosten lineaarisuuskuvaaja

Korrelaatiokerroin laskettiin selitysasteesta kaavan 1 avulla. Korrelaatioker-  
toimeksi saatiin 0,9995, joten se täytti vaatimuksen  $r \geq 0,99$ .

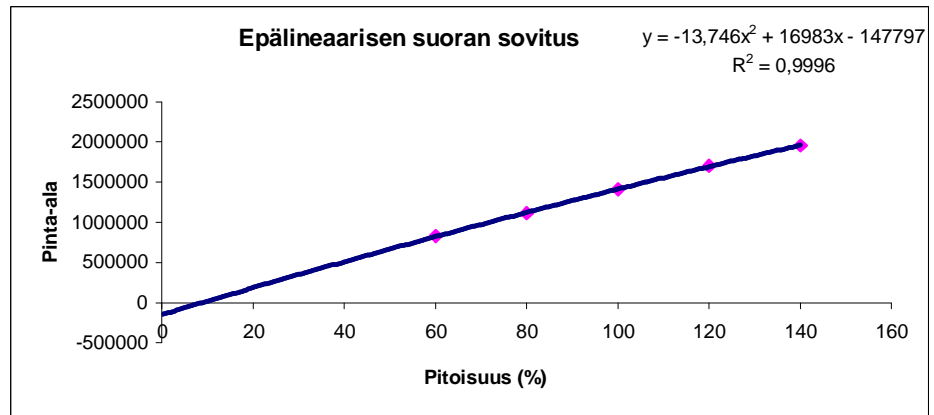
Tarkasteltiin suoran lineaarisuutta residuaalikuvaajan perusteella piirtämällä  
residuaalikuvaaja (kuva 12).



Kuva 12. Näyteliuosten residuaalikuvaaja

Residuaalikuvajaa tarkasteltaessa ei oltu täysin varmoja suoran lineaarisuu-  
desta. Tehtiin lineaarisuuden testaus F-testillä. Testaus perustuu FM Erkki  
Ojaniemen luento, jonka aiheena oli "Menetelmien ja laitteiden validointi  
teollisuuden laboratoriossa" [16].

siin sovitettiin epälineaarinen suora (kuva 13).



Kuva 13. Epälineaarisen suoran sovitus

Korrelaatiokerroin oli 0,9998 ja se täytti annetun vaatimuksen. Teoreettiset pinta-alat sekä residuaalit ja niiden neliöt laskettiin suoran yhtälön perusteella (taulukko 6).

Taulukko 6. Epälineaarisen suoran sovituksen avulla lasketut teoreettiset pinta-alat, residuaalit sekä niiden neliöt

Pitoisuus (%)	Pinta-ala	Teor.pinta-ala	Residuaali	Residuaali^2
60	827177	821697	5480	30026016
80	1112227	1122869	-10642	113243651
100	1411774	1413043	-1269	1610361
120	1704399	1692221	12178	148313427
140	1954420	1960401	-5981	35777146

Verrattiin lineaarisen- ja epälineaarisen suoran variansseja laskemalla niiden erotus  $DS^2$  kaavalla 2,

$$DS^2 = (n-2)s_{(y/x)1}^2 - (n-3)s_{(y/x)2}^2 \quad (2)$$

jossa:  $s_{(y/x)1}$  on lineaarisen suoran hajonta

$s_{(y/x)2}$  on epälineaarisen suoran hajonta

$n$  on suoran lukuparien määrä = 5.

at laskettiin kaavoilla 3.

$$s_{(y/x)1} = \sqrt{\frac{(y - \hat{y}_1)^2}{n-2}}, s_{(y/x)2} = \sqrt{\frac{(y - \hat{y}_2)^2}{n-3}} \quad (3)$$

F-arvo laskettiin kaavalla 4.

$$F = \frac{DS^2}{s_{(y/x)2}^2} \quad (4)$$

Jos laskettu F-arvo oli pienempi kuin taulukkoarvo, lineaarisuusaluetta ei tarvinnut pienentää, eikä toisen asteen yhtälön sovitus ollut lineaarista sovitusta parempi.

Kaavojen 2 - 4 avulla laskettiin F-arvo. F-arvoksi saatiin 5,20. Taulukkoarvo oli 10,13. Koska 5,20 < 10,13, niin lineaarinen suoran sovitus oli epälineaarista suoran sovitusta parempi ja lineaarisuusaluetta ei tarvittu pienentää.

Menetelmä oli lineaarinen pitoisuusalueella 60 - 140 % tavoitepitoisuudesta näyte- ja standardiliuoksilla.

## 6.2 Oikeellisuus

Menetelmän systemaattiset virheet tutkittiin saantokokeiden avulla. Taulukossa 7 on esitelty eri pitoisuustasoilla mitattujen saantokokeiden tulokset sekä niiden luottamusvälit.

Taulukko 7. Eri pitoisuustasojen saantokokeiden tulokset

60 %		100 %		140 %	
Näyte	Saanto-%	Näyte	Saanto-%	Näyte	Saanto-%
1	105,120	1	103,825	1	102,421
2	104,165	2	104,268	2	102,466
3	105,914	3	104,047	3	103,134
<b>Ka</b>	105,066	<b>Ka</b>	104,047	<b>Ka</b>	102,674
<b>SD</b>	0,876	<b>SD</b>	0,221	<b>SD</b>	0,399
<b>RSD</b>	0,830	<b>RSD</b>	0,210	<b>RSD</b>	0,390
Luottamusväli	± 2,175	Luottamusväli	± 0,550	Luottamusväli	± 0,992
Luottamusväli on 105,0 ± 2,2 %		Luottamusväli on 104,0 ± 0,6 %		Luottamusväli on 103,0 ± 1,0 %	

luottamusväli (95 %) laskettiin kaavan 5 avulla,

$$\text{Saannoille luottamusväli} = \bar{x} \pm \frac{t^* s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

jossa  $t$  on taulukkoarvo (vapausaste 2),  $s$  keskihajonta ja  $n$  otoksen koko.

Kun luottamusväli laskettiin otoksesta, jossa kaikki mittaustulokset oli yhdistetty, luottamusväliksi saatiin  $103,9 \pm 0,9$  % (vapausaste 8).

Saantoprosentti 103,9 % täytti vaatimuksen, jonka mukaan saantoprosentin tuli olla 90,0 . 110,0 % rajoissa. Systemaattiseksi virheeksi saatiin 3,9 %.

Suhteellisen keskihajonnan (RSD) tuli olla enintään 2,0. Eri sarjojen suhteelliset keskihajonnat on ilmoitettu taulukossa 7. Sarjojen suhteelliset keskihajonnat täyttivät vaatimuksen. Kaikista mittauksista laskettiin yhteinen RSD kaavan 6 mukaan.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} * 100\% \quad (6)$$

RSD oli 1,1 % ja täytti vaatimuksen.

Tulosten perusteella pääteltiin, että menetelmän systemaattinen virhe, 3,9 %, ei ole liian suuri. Kun systemaattisia virheitä verrattiin eri pitoisuustasoilla, huomattiin, että pienin systemaattinen virhe saatiin korkeimmalla pitoisuustasolla.

Toistettavuus jaettiin menetelmän toistettavuuteen ja laboratorion sisäiseen uusittavuuteen.

Menetelmän toistettavuus määritettiin saantokokeiden tuloksilla ja niistä laskettiin keskiarvo, keskihajonta (SD) ja suhteellinen keskihajonta (RSD) (taulukko 8).

Taulukko 8. Oikeellisuuskokeen saantoprosentit, keskiarvo, SD ja RSD

	Saanto-%
1	105,12
2	104,17
3	105,91
4	103,83
5	104,27
6	104,05
7	102,42
8	102,47
9	103,13
ka	103,93
SD	1,15
RSD	1,11

Suhteellinen keskihajonta kertoi menetelmän toistettavuuden, joka oli 1,1 %.

Laboratorion sisäinen uusittavuus tutkittiin kolmena eri päivänä. Joka päivä valmistettiin kuusi rinnakkaista näytettä ja uusi standardisuora. Näytteet valmistettiin analyysiohjeen mukaan ja niiden pitoisuudet mitattiin (taulukko 9).

Taulukko 9. Näytteiden pitoisuudet kolmelta eri päivältä

	Näyte 1 (mg/g)	Näyte 2 (mg/g)	Näyte 3 (mg/g)	Näyte 4 (mg/g)	Näyte 5 (mg/g)	Näyte 6 (mg/g)
Päivä 1	45,46	44,41	45,33	46,02	45,66	45,66
Päivä 2	46,15	45,26	45,91	45,17	46,21	45,14
Päivä 3	45,64	45,70	45,77	45,28	46,12	46,41

lattiin varianssianalyysillä (ANOVA). Varianssianalyysi mittaa  
 erojen välistä hajontaa ja ryhmien sisäistä hajontaa. Jos ryh-  
 mien keskiarvot eroavat merkitsevästi toisistaan, niin ryhmien välisestä va-  
 rianssista tulee lisäkomponentti kokonaisvarianssiin (taulukko 10).

Taulukko 10. Uusittavuus näytteiden varianssianalyysi

Anova: yksisuuntainen

YHTEENVETO

Ryhmät	Lukumäärä	Summa	Keskiarvo	Varianssi
Rivi 1	6	272,5457	45,42428	0,304101
Rivi 2	6	273,8454	45,64090	0,253789
Rivi 3	6	274,9118	45,81863	0,156134

ANOVA

Vaihtelun lähde	NS	va	KN	F	P-arvo	F-kriittinen
Luokkien välissä	0,4680360	2	0,234018	0,983235	0,396961	3,6823167
Ryhmissä	3,5701232	15	0,238008			
Yhteensä	4,0381592	17				

Taulukossa 10 on esitetty laskettu F-arvo ja kriittinen F-arvo 95 % luottamus-  
 tasolla. Koska laskettu F arvo oli pienempi kuin F-kriittinen arvo, eivät sarjo-  
 jen sisäiset, eivätkä sarjojen väliset varianssit eronneet merkittävästi toisis-  
 taan 95 % luottamustasolla.

Laboratorion sisäinen uusittavuus saatiin selville varianssianalyysin tuloksis-  
 ta. Päivien sisäinen varianssi,  $s^2$ , oli 0,238. Päivien sisäinen hajonta lasket-  
 tiin kaavan 7 avulla.

$$\text{Päivien sisäinen hajonta} = \sqrt{KN_{sis}} = \sqrt{0,238} = 0,488 \quad (7)$$

Suhteellisenä arvona päivien sisäinen hajonta oli 1,1 %, jota käytettiin labo-  
 ratorion sisäisenä uusittavuutena. Laboratorion sisäinen uusittavuus oli pie-  
 ni. Tämä johtui luultavasti siitä, että mittaukset suoritettiin pienellä aikavälillä.  
 Mittauksia pitäisi suorittaa pidemmän ajan kuluessa, jolloin sisäisen uusitta-  
 vuuden arvo olisi luotettavampi.

saatiin yhdistämällä menetelmän toistettavuus ja laboratorion toistettavuus kaavan 8 avulla.

$$\text{Toistettavuus} = \sqrt{\text{menetelmän toistettavuus}^2 + \text{sis. uusittavuus}^2} \quad (8)$$

Toistettavuudeksi saatiin 2 %. Menetelmä oli toistettava.

## 6.4 Spesifisyys

Spesifisyydessä tutkittiin mahdollisia analyysiä häiritseviä tekijöitä sekä hajoamistuotteiden erottumista.

Tutkimukset aloitettiin hajotuskokeilla. Tehtiin emäs-, happo- ja vetyperoksidihajotukset.

### *Emäshajotus*

Emäshajotus tapahtui 1 M NaOH-liuoksen avulla. Tunnin hajotuksen jälkeen pääpiikin viereen oli alkanut kehittyä tuntematon piikki. Piikki johtui tuntemattomasta hajoamistuotteesta. Kahden tunnin kuluttua hajoamistuotteen piikki oli kasvanut ja se oli erottunut pääpiikistä. Kolmen tunnin kuluttua ilmestyi toisen hajoamistuotteen piikki. Hajoamistuote tunnistettiin retentioajan perusteella p-kloorianiliiniksi.

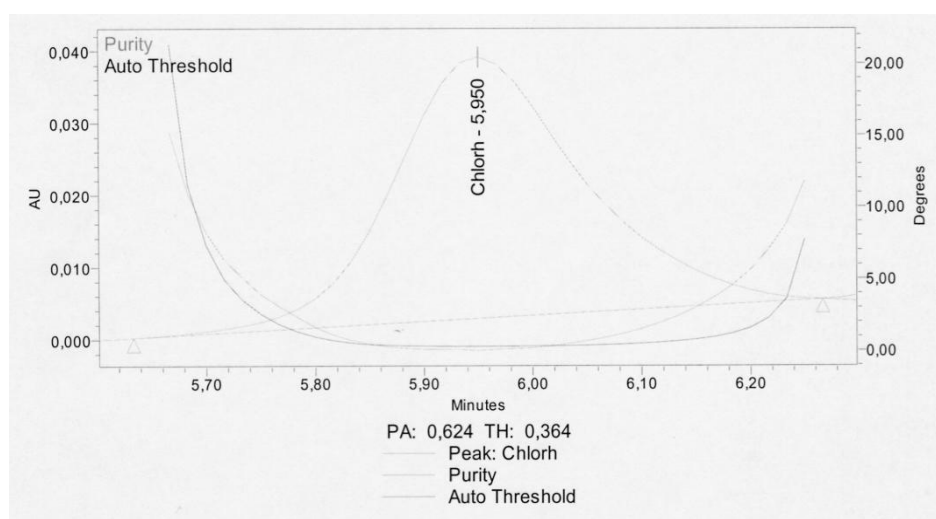
Tarkasteltiin pääpiikin ja hajoamistuotteiden piikkien pinta-aloja ja niiden prosenttisia osuuksia hajoamattoman pääpiikin koosta eri hajotusvaiheissa. Lisäksi tutkittiin, millä retentioajalla hajoamistuotteet tulivat ulos kolonnista (taulukko 11).

*Taulukko 11. Pääpiikin ja hajoamistuotteiden piikkien pinta-alat ja niiden prosenttinen osuus hajoamattoman pääpiikin koosta sekä hajoamistuotteiden retentioajat*

Hajotusaika (h)	Pääpiikin pinta-ala	Pinta-ala (%)	Haj.tuott. Rt	Haj.tuott. pinta-ala	Haj.tuott. pinta-ala-%
0	1339489	100,0			
1	1029128	76,8			
2	775397	57,9	6,5	100 221,0	7,5
3	441410	33,0	6,5 8,6	252742,0 39935,0	18,9 3,0



a piikin puhtautta huomattiin, että pääpiikki ei ollut täysin puh-  
 nin hajotuksen jälkeen (kuva 14). Piikin puhtaus nähtiin suo-  
 raan HPLC:n antamista tuloksista. Puhtaus määritettiin vertaamalla laitteen  
 antamia puhtaus- ja kynnysarvoja (threshold). Kynnysarvo on arvo, jota tar-  
 vitaan piikin toteamiseksi. Kun signaalin kulmakerroin ylittää kynnysarvon,  
 signaali todetaan piikiksi. Kynnysarvon vuoksi laite ei tulkitse kohinaa pii-  
 keiksi. Jos puhtausarvo oli kynnysarvoa pienempi, piikki oli puhdas. [13, s.  
 183; 17.]



Kuva 14. Klooriheksidiinipiikin puhtaus kolmen tunnin emäshajotuksen jälkeen

Emäshajotuksessa puhtausarvo oli 0,624 ja kynnysarvo 0,364.

$0,624 > 0,364$ , joten piikki ei ollut puhdas. Luultavasti syynä oli pääpiikin vie-  
 reen syntynyt hajoamistuotteen piikki. Kun tarkasteltiin puhtaus- ja kyn-  
 nysarvokäyriä, huomattiin, että piikin häntä oli epäpuhdas. Hajoaminen oli  
 vielä käynnissä. Liitteestä 2 löytyy näytteen kromatogrammit 1, 2 ja 3 tunnin  
 emäshajotuksen jälkeen.

### Happohajotus

Happohajotus tehtiin 1 M HCl-liuoksen avulla. Hajoaminen tapahtui emäsha-  
 jotusta nopeammin. p-Kloorianiliinin piikki näkyi heti ensimmäisen tunnin ha-  
 jotuksen jälkeen ja kolmen tunnin kuluttua p-kloorianiliinin piikki oli jo noin

oi kuin pääpiikki. Muita hajoamistuotteita ei happohajotukses-

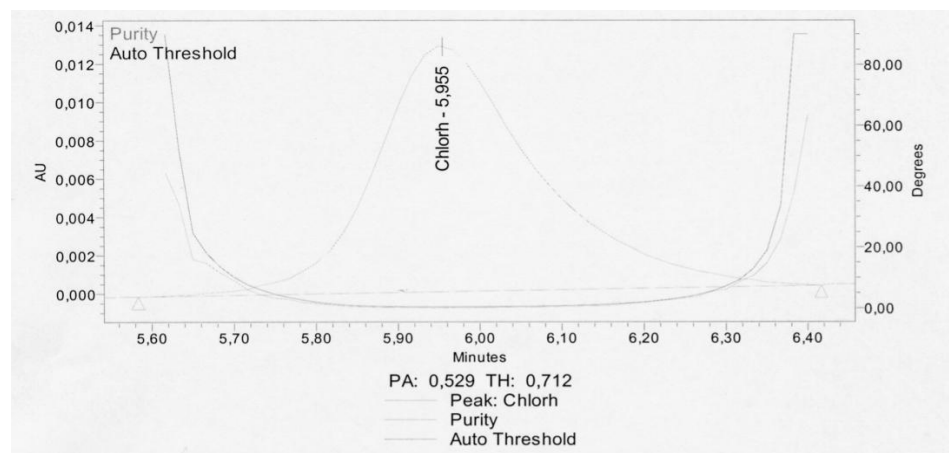
Tarkasteltiin pääpiikin ja p-kloorianiliinipiikkien pinta-aloja sekä niiden prosentuaalisia osuuksia hajoamattoman pääpiikin koosta eri hajotusvaiheissa. Lisäksi tutkittiin hajoamistuotteen retentioaikoja (taulukko 12).

*Taulukko 12. Pääpiikkien ja hajoamistuotteen piikkien pinta-alat ja niiden prosenttinen osuus hajoamattoman pääpiikin koosta sekä hajoamistuotteen retentioajat*

Hajotusaika (h)	Pääpiikin pinta-ala	Pinta-ala (%)	Haj.tuott. Rt	Haj.tuott. pinta-ala	Haj.tuott. pinta-ala-%
0	1339489	100,0			
1	833202	62,2	8,6	88060	6,6
2	407133	30,4	8,6	231 207	17,3
3	177785	13,3	8,6	375 681	28,0

Kolmen tunnin happohajotuksen jälkeen pääpiikin puhtautta tarkasteltaessa huomattiin, että pääpiikki oli puhdas (kuva 15). Siitä ei ollut erottumassa muita piikkejä. Piikin puhtausarvo oli 0,529 ja kynnysarvo oli 0,712.

$0,529 < 0,712$ , joten piikki oli puhdas.



*Kuva 15. Pääpiikin puhtaus kolmen tunnin happohajotuksen jälkeen*

Liitteestä 3 löytyy näytteen kromatogrammit 1, 2 ja 3 tunnin happohajotuksen jälkeen.

ajotus

ajotuksessa kokeiltiin ensin huoneenlämmössä hajotusta. Hajoamista ei tapahtunut. Lisäksi kokeiltiin hajotuksia 30 ja 60 °C:ssa. Hajoamista ei tapahtunut. Nostettiin lämpötila 100 °C:seen. Tässä lämpötilassa klooriheksidiini alkoi hajota ja tuntematon hajoamistuote muodosti piikin pääpiikin viereen. Tutkittiin pääpiikin ja hajoamistuotteen pinta-aloja sekä niiden prosentuaalisia osuuksia hajoamattoman pääpiikin koosta eri hajotusvaiheissa. Lisäksi tarkasteltiin hajoamistuotteen retentioaikoja (taulukko 13).

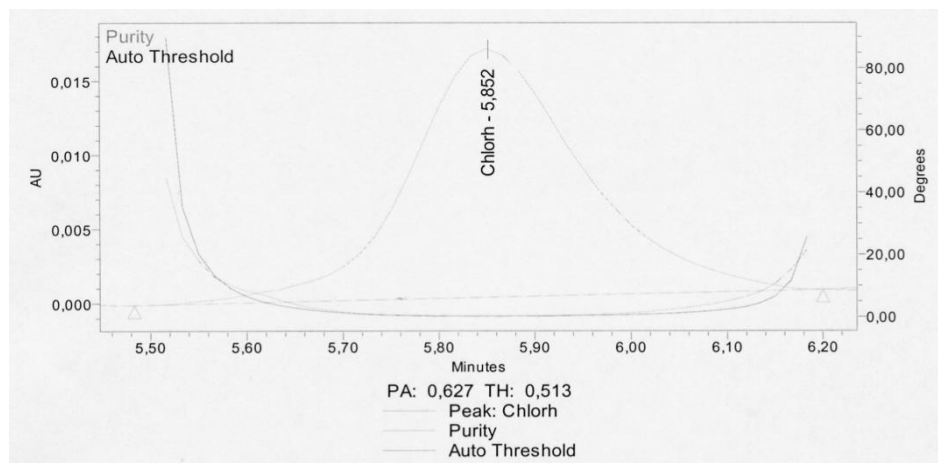
*Taulukko 13. Pääpiikin ja hajoamistuotteen piikin pinta-alat ja niiden prosenttinen osuus hajoamattoman pääpiikin koosta sekä hajoamistuotteen retentioajat*

Hajotusaika (h)	Pääpiikin pinta-ala	Pinta-ala (%)	Haj.tuott. Rt	Haj.tuott. pinta-ala	Haj.tuott. pinta-ala-%
0	1332300	100,0			
1	919831	69,0			
2	528498	39,7	6,4	79 183	5,9
3	211302	15,9	6,4	121 816	9,1

Piikin puhtautta tutkittaessa huomattiin, että pääpiikki ei ollut aivan puhdas (kuva 16). Tämä johtui luultavasti siitä, että hajoamistuotteen piikki oli lähellä pääpiikkiä ja hajoaminen oli vielä käynnissä.

Piikin puhtausarvo oli 0,627 ja kynnyсарvo 0,513.

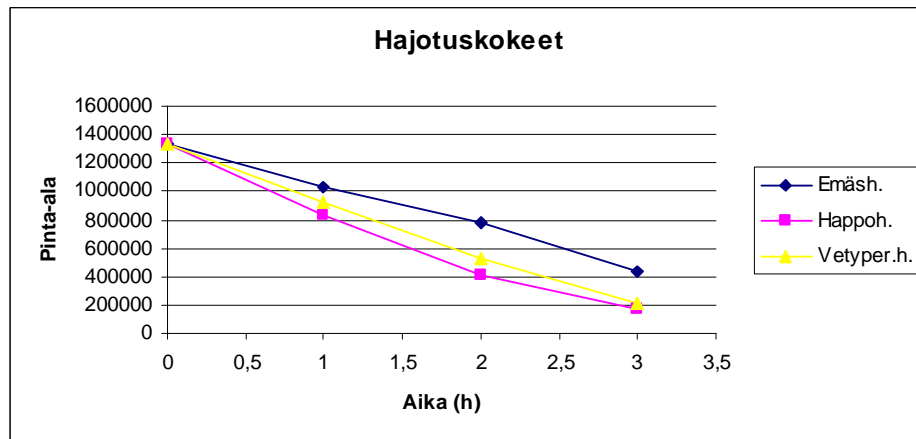
$0,627 > 0,513$ , joten piikki ei ollut puhdas.



*Kuva 16. Pääpiikin puhtaus kolmen tunnin peroksidihajotuksen jälkeen*

Liitteestä 4 löytyy näytteen kromatogrammit 1, 2 ja 3 tunnin peroksidihajotuksen jälkeen.

esitetty pääpiikin hajoaminen kaikissa kolmessa hajotuksessa. Nähtiin, että nopein hajoaminen tapahtui happamissa olosuhteissa ja hitain hajoaminen emäksisissä olosuhteissa. Tarkasteltaessa piikin puhtauksia huomattiin, että pääpiikki oli puhtain happohajotuksessa. Emäksisissä olosuhteissa klooriheksidiini hajosi hitaimmin muodostaen kahta eri hajoamistuotetta. Happohajotus tapahtui nopeimmin ja se muodosti hajoamistuotteena ainoastaan p-kloorianiliinia.



Kuva 17. Pääpiikin hajoaminen emäs-, happo- ja vetyperoksidihajotuksissa

Ajoliuoksen ja uuttoliuoksen vaikutusta menetelmään tutkittiin injektoimalla kumpaakin liuosta. Liuoksista ei tullut piikkejä kromatogrammeihin, joten ne eivät häirinneet analyysiä.

Taustan vaikutus tutkittiin injektoimalla plasebo-näytettä. Näyte valmistettiin punnitsemalla 0,25 g voidepohjaa 50 ml:n mittapulloon, ja se käsiteltiin analyysiohjeen mukaan. Plasebo-näytteen kromatogrammiin tuli voidepohjassa olevasta metyyli parahydroksybentsoaatista johtuva piikki, joka ei häiritse klooriheksidiiniä. Muita piikkejä ei kromatogrammissa havaittu.

Tutkittiin tunnetun hajoamistuotteen, p-kloorianiliinin, häiritsevyys analyysissä. Punnitettiin mittapulloon 0,25 g voidepohjaa ja 1,5 mg p-kloorianiliinia. Näyte käsiteltiin analyysiohjeen mukaan. Kromatogrammiin ilmestyi voidepohjasta tuleva metyyli parahydroksybentsoaatin piikki ja p-kloorianiliinin piikki. Kumpikaan piikeistä ei tullut ulos samalla retentioajalla kuin klooriheksidiini.

Epäpuhtaudet, taustamatriisi ja käytettävät reagenssit eivät häirinneet analyysiä.

### 6.5 Menetelmän haavoittuvuus

Menetelmän haavoittuvuudessa tehtiin pieniä muutoksia näytteenkäsittelyyn ja ajo-olosuhteisiin. Tutkittiin, miten herkkä menetelmä oli pienille muutoksille.

Ensimmäiseksi tutkittiin suodatuksen vaikutusta menetelmään. Valmistettiin 100 % standardiliuos ja injektointiin sitä suodatettuna ja ilman suodatusta. Kummastakin liuoksesta tehtiin viisi injektointia.

Tarkasteltiin standardiliuosten piikkien pinta-aloja, niiden keskiarvoja ja suhteellisia keskihajontoja (taulukko 14).

*Taulukko 14. Pinta-alat suodatetuista ja suodattamattomista näytteistä sekä niiden keskiarvot ja suhteelliset keskihajonnat*

Injektointi	Suodatettu	Suodattamaton
1	1326808	1369074
2	1322660	1367698
3	1339844	1383096
4	1320119	1364914
5	1330947	1408130
ka	1328076	1378582
RSD	0,58	1,30

Verrattaessa pinta-alojen keskiarvoja huomattiin, että suodattamattomasta standardiliuoksesta saatiin 3,7 % suurempi pinta-ala. RSD on suodattamattomissa näytteissä huomattavasti suurempi. Pinta-alojen takia standardiliuoksia ei välttämättä tarvitsisi suodattaa, mutta korkean RSD:n vuoksi suodattaminen on suositeltavaa.

on esitetty muut tehdyt muutokset ja niiden vaikutukset reten-  
kapasiteettitekijään ( $k'$ ), häntimistekijään ( $T$ ) ja teoreettiseen  
pohjalukuun ( $N$ ).

*Taulukko 15. Menetelmään tehdyt muutokset ja niiden vaikutus kromatografisiin tun-  
nuslukuihin*

	Muutos	$R_t$	$k'$	$T$	$N$
<b>Menetelmän olo- suhteet</b>	STA C	5,959	0,99	1,3	5371
<b>Muutettava olo- suhde</b>					
Virtausnopeus	0,5 ml/min	7,197	1,40	1,32	5389
Virtausnopeus	0,7 ml/min	5,105	0,70	1,53	5602
Ajol.komponenttien muutos	40:60	Piikki sekoittuu liuotinpiikkiin			
Ajol.komponenttien muutos	30:70	12,951	3,32	1,19	7286
Ajol.koostumus	40 mM	5,703	0,90	1,27	1476
Ajol.koostumus	60 mM	6,286	1,10	1,29	1676
Ajol.pH	2	Pohjakohina suurta, piikki huono			
Ajol. pH	4	5,810	0,94	1,25	2017
Injektioilavuus	5 $\mu$ l	5,860	0,95	1,24	7059
Injektioilavuus	15 $\mu$ l	5,881	0,96	1,32	4952
<b>Menetelmän olo- suhteet</b>	NÄYTE	5,903	0,97	1,22	2511
Uutto aika	10 min	5,894	0,96	1,20	2568
Uutto aika	20 min	5,895	0,97	1,26	2526

Virtausnopeutta hidastettaessa retentioaika ja kapasiteettitekijä kasvoivat. Muut tunnusluvut pysyivät lähes samana. Kun virtausnopeutta kasvatettiin, retentioaika ja kapasiteettitekijä pienenevät ja häntimistekijä kasvoi. Kapasiteettitekijä laski alle raja-arvon. Virtausnopeuden kasvattaminen ei antanut mitään positiivisia vaikutuksia menetelmään. Virtausnopeuden hidastaminen paransi kapasiteettitekijää, mutta samalla se pidensi retentioajan kasvun myötä ajoaikaa.

Menetelmässä ajoliuosten suhteet olivat 35:65. Kun asetoniiniliin osuutta ajoliuoksessa kasvatettiin, kloorihexidiinin piikki sekoittui liuotinpiikkiin. Asetoniiniliin osuutta vähennettäessä retentioaika kasvoi noin kaksinkertaiseksi. Myös kapasiteettitekijä ja teoreettinen pohjaluku kasvoivat. Asetoniiniliin osuutta ajoliuoksessa ei voitu kasvattaa, mutta sen vähentäminen oli mahdollista, jos ajoajasta haluttiin tehdä kaksi kertaa pitempi.

koostumusta muutettaessa 50 mM:sta laimeammaksi ja vah-  
jaluku laski liian pieneksi. Pohjaluvun tuli olla yli 2000. Reten-  
tioajassa ja kapasiteettitekijässä tapahtui pieniä muutoksia. Ajoliuoksen  
koostumusta ei kuitenkaan pohjaluvun pienenemisen vuoksi voitu muuttaa.

Injektiotilavuuden pienentäminen vaikutti ainoastaan teoreettisen pohjaluvun  
kasvuun. Injektiotilavuuden suurentaminen ei vaikuttanut merkittävästi mi-  
hinkään kromatografisista tunnusluvuista.

Näytteen käsittelyssä tutkittiin uuttoajan vaikutusta menetelmään. Uuttoaikaa  
lyhennettiin 10 minuuttiin ja pidennettiin 20 minuuttiin. Kumpikaan muutos ei  
vaikuttanut menetelmään ja kromatografiset tunnusluvut pysyivät samoina.

Kun puskurin pH laskettiin kahteen, menetelmä ei toiminut. Pohjakohina oli  
suurta ja piikistä tuli epäselvä. Kromatogrammi oli niin epäselvä, että kroma-  
tografisia tunnuslukuja ei voitu laskea. Kun pH nostettiin neljään, menetelmä  
oli toimiva. Kromatografiset tunnusluvut eivät kuitenkaan parantuneet.

Jos menetelmää haluttiin parantaa, kannatti virtausnopeutta hidastaa ja ase-  
tonitriilin määrää ajoliuoksessa vähentää. Tämä tarkoitti samalla ajoajan pi-  
tenemistä.

### *Säilyvyystutkimus*

Säilyvyystutkimus tehtiin standardi- ja näyteliuoksista. Toiset liuokset säily-  
tettiin valolta suojaamattomana ja toiset valolta suojattuna. Liuokset analy-  
soitiin vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluttua. Lisäksi tutkittiin näyt-  
teen säilyvyys näytteensyöttäjän injektioapullossa (vial).



äytteen antamia kromatografisia tunnuslukuja vuorokauden ja  
auden kuluttua (taulukko 16).

*Taulukko 16. Näytteen kromatografiset tunnusluvut vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluttua*

	RT	k'	T	N	Pinta-ala
<b>Näyteliuos valossa</b>	5,903	0,97	1,22	2511	959332
1 pv kuluttua	5,936	0,98	1,22	2414	966111
2 pv kuluttua	5,795	0,93	1,18	2205	949625
<b>Näyteliuos pimeässä</b>	5,899	0,97	1,20	2550	967546
1 pv kuluttua	5,936	0,98	1,21	2439	956994
2 pv kuluttua	5,811	0,94	1,16	2189	922874
<b>Näyteliuos vialissa</b>	5,903	0,97	1,22	2511	959332
1 pv kuluttua	5,941	0,98	1,21	2483	965818
2 pv kuluttua	5,801	0,93	1,16	2319	944966

Näyteliuoksen säilyvyydelle asetettu vaatimus oli 12 tuntia. Tämä takasi turvallisen yön yli analysoinnin. Tuloksista huomattiin, että näyteliuoksen säilytyspaikalla ei ollut merkitystä. Tärkeintä oli, että pinta-ala ei muutu paljoa säilytyksen aikana. Pinta-alojen muutos oli noin 2 %, mikä on hyväksyttävä taso. Säilyvyys valossa, pimeässä ja näytteensyöttäjän injektioapullossa oli samanlaista. Näyteliuokset säilyivät ainakin kaksi vuorokautta. Kromatografiset tunnusluvut alkoivat muuttua ensimmäisen vuorokauden jälkeen, mutta muutos ei ollut vielä huomattavaa (taulukko 17).

*Taulukko 17. Standardiliuoksen kromatografiset tunnusluvut vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluttua*

	RT	k'	T	N	Pinta-ala
<b>Standardil. valossa</b>	5,915	0,97	1,23	2546	1020589
1 pv kuluttua	5,945	0,98	1,21	2393	1000372
2 pv kuluttua	5,809	0,94	1,17	2214	999182
<b>Standardil. pimeässä</b>	5,912	0,97	1,23	2517	1010005
1 pv kuluttua	5,941	0,98	1,21	2378	987122
2 pv kuluttua	5,805	0,93	1,19	2210	977138
<b>Standardil. vialissa</b>	5,915	0,97	1,23	2546	1020589
1 pv kuluttua	5,952	0,98	1,20	2397	1009232
2 pv kuluttua	5,798	0,93	1,17	2216	997445

Standardiliuoksen säilyvyys oli samanlainen kuin näytteen säilyvyys. Molemmat liuokset täyttivät annetun 12 tunnin säilyvyysvaatimuksen.



uiden validointimittausten tuloksia. Tulosten perusteella menetelmän määritysalue oli 60 - 140 % tavoitepitoisuudesta, koska menetelmä oli lineaarinen, toistettava ja tarkka tällä alueella.

## 7 ERÄVARASTONÄYTTEIDEN ANALYSOINTI

Kun menetelmä oli validoitu, aloitettiin erävarastonäytteiden analysointi. Erävarastosta löytyi näytteitä, joiden käytettävä viimeistään -päivämäärä oli 07.2004 - 10.2006 välillä.

Näytteet analysoitiin luodun analyysiohjeen mukaan. Taulukossa 18 on esitelty erävarastonäytteiden vanhenemispäivät ja niille tutkimusten tuloksina saadut klooriheksidiinipitoisuudet.

*Taulukko 18. Erävarastonäytteiden vanhenemispäivät ja pitoisuudet*

Näyte	Käyt.viim.	Pitoisuus (mg/g)
1	1.7.2004	54,3
2	1.3.2006	45,3
3	1.7.2006	49,0
4	1.7.2006	44,3
5	1.10.2006	43,9

Hajoamistuotteita näytteiden kromatogrammeissa ei havaittu. Sen sijaan näytteiden klooriheksidiinipitoisuus vaihteli huomattavasti. Seuraavana päivänä valmistettiin uudet näytteet samoista voiteista. Tulokset olivat samantaisia, joten tuloksia voitiin pitää luotettavina.

Tuloksista pääteltiin, että klooriheksidiinin säilyvyys voiteessa oli hyvä ja annettu kahden vuoden kesto aika ei ollut liian pitkä. Sen sijaan voiteen valmistusprosessi ei ollut virheetön. Esimerkiksi raaka-aineen käyttöpitoisuutta ei oteta valmistusvaiheessa huomioon. Teoreettinen klooriheksidiinipitoisuus vesirokkovoiteessa oli 50 mg/g. Jokaisen erän klooriheksidiinipitoisuus oli kuitenkin erilainen ja vaihteli huomattavasti teoreettisen pitoisuuden molemmien puolin.

ntimittausten, standardiliuosta injektoitaessa, klooriheksidiini-piikin viereen alkoi erottua toinen piikki. Mitään ajo-olosuhteissa ja näytteenkäsittelyssä ei ollut muutettu. Injektoitiin uuttoliuosta ja puskuriliuosta. Kumpikaan liuoksista ei muodostanut piikkiä ylimääräisen piikin kohdalle. In-House-standardia avattiin uusi samaa erää oleva pullo, mutta ongelma ei poistunut. Kolonnia pestiin, mutta piikki ilmestyi myös pesun jälkeen. Ylimääräinen piikki kuitenkin pieneni hiukan pesun jälkeen. Koska In-House-standardin vaihto ei vaikuttanut tuloksiin eikä reagensseista aiheutunut häiriöpiikkejä, epäiltiin, että ongelma oli kolonnissa. Luultavasti kolonni oli mittausten edetessä tasapainottunut ja alkoi nyt erottaa ylimääräiset piikit herkemmin. Kolonnia oli käytetty aikaisemmin muihin analyyseihin.

Kun laitteella ajettiin välissä toista raaka-ainetta, vieras piikki hävisi. Toista raaka-ainetta ajettiin eri kolonnilla ja eri ajoliuksilla. Piikki ei kuitenkaan ollut yhtä hieno kuin mittausten alussa. Piikki oli häntivämpi kuin siihen astisissa mittauksissa.

Koska ongelmaan ei löytynyt ratkaisua, oli integrointia muutettava ja mittauksia jatkettava.

## EET

Seuraavana on lueteltu käytetyt laitteistot ja välineet:

- Watersin HPLC: Alliance 2695 separation module
- Watersin PDA-Detektor: Photodiode Array Detector 2996
- Watersin kolonniuuni: Alliance column heater
- Ultraäänihaude: Bandelin Sonorex
- Analyysivaaka: Mettler AT200
- Analyysivaaka Mettler Toledo
- Kalvo-vakuumpumppu
- Tasoravistelijä
- Membraanisuodatin: GH Polypro 47 mm 0,45 µm
- Ruiskusuodatin: Millipore Millex 25 mm 0,45 µm
- Kolonni: XTerra Phenyl 3,5 µm 4,6 x 150 mm Column
- Kolonni: Gemini 5 u C18 110 A 150 x 4,60 mm
- Lämpökaappi.

Lisäksi käytössä oli yleiset laboratoriovälineet.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, oliko Yliopiston Apteekki määrittänyt Professorin vesirokkovoiteelle liian pitkän kestoajan. Työ suoritettiin kehittämällä HPLC-menetelmä klooriheksidiinipitoisuuden määrittämiseksi vesirokkovoiteesta. Menetelmä validoitiin ja vanhoja vesirokkovoiteita analysoitiin kehitetyn menetelmän avulla. Tulosten perusteella pääteltiin, oliko kesto aika liian pitkä.

Tavoite saavutettiin hyvin. Kehitetystä menetelmästä tuli toimiva ja tutkimuksen tulos oli hyvä, koska voiteelle annettu kahden vuoden kesto aika ei ollut ylimitoitettu. Klooriheksidiini säilyy voiteessa ainakin kolme vuotta. Pidemmältä aikajaksolta näytteitä ei erävarastosta löytynyt. Tutkimuksissa kuitenkin huomattiin, että klooriheksidiinipitoisuus eri voide-erien välillä vaihteli huomattavasti. Tämän tutkimuksen perusteella vesirokkovoiteen klooriheksidiinipitoisuuden seuraaminen oli aiheellista, minkä myötä oli suositeltavaa aloittaa uusi säilyvyysseurantatutkimus.

Professorin vesirokkovoide oli DF:n valmiste, jonka mukaan valmisteelle annettu kesto aika oli puoli vuotta. Yliopiston Apteekki tekee säilyvyysseurantatutkimuksia yleensä vain omista valmisteista. Koska vesirokkovoide oli DF:n valmiste, säilyvyysseurantatutkimusta tälle tuotteelle ei vaadita. Säilyvyysseurantatutkimus oli kuitenkin tehty käyttöä pidentämiseksi, ja tulosten perusteella kesto aikaa oli päätetty nostaa kahteen vuoteen. Säilyvyysseurantatutkimus tehtiin aikaisemmin sokkotestinä neljällä koehenkilöllä. Koehenkilöiden käsille levitettiin vastavalmistettua voidetta ja vanhempaa voidetta. Voiteiden viilentävää vaikutusta ja mentolin tuoksua vertailtiin. Jos eroa ei havaittu, oli voide vielä käyttökelpoista. Viimeisestä tutkittavasta erästä tutkittiin lisäksi mikrobiologinen puhtaus, joka täytti laatuvaatimukset. Näiden tutkimusten pohjalta oli perusteltua antaa voiteelle kahden vuoden kesto aika. Edellisen säilyvyysseurantatutkimuksen aikana pitoisuusmenetelmää klooriheksidiinille ei vielä ollut. Uudessa säilyvyysseurantatutkimuksessa tulisi tutkia lisäksi voiteen klooriheksidiinipitoisuus ja tarkastella klooriheksidiinin säilyvyyttä voiteessa.

...yvin ja menetelmästä tuli toimiva. Menetelmän parantaminen on kuitenkin vielä mahdollista. Jos menetelmälle haluaisi tehdä jatkotutkimuksia, ne voisi aloittaa kolonnin tutkimisesta. Työn aikana avoimeksi kysymykseksi jäi se, miksi klooriheksidiinipiikin muoto alkoi muuttua huonommaksi kesken mittauksen. Ratkaisuna voisi olla kolonnin vaihto, jolloin nähtäisiin, johtuiko piikin muoto kolonnista. On mahdollista, että kolonnin käyttöikä alkoi olla loppumassa.

Näytteet suodatettiin Milliporen 0,45 µm:n PTFE-ruiskusuodattimilla. Suodatuksen vaikutus näkyi haavoittuvuuskokeissa standardiliuosta tutkittaessa. On mahdollista, että suodatuksen vaikutus olisi pienempi jollain toisella suodattimella. Koska näytteenä oli voide, joka propanoli-vesi -seoksen kanssa muodosti samean liuoksen, ei sitä voitu injektoida suodattamattomana. Tämän vuoksi suodatuksen vaikutusta näytteessä ei voitu tutkia. Koska suodattimen käyttö näytteessä on pakollista, suodattimien vertailu näytteiden kohdalla olisi järkevää.

Menetelmää voidaan myös laajentaa kehittämällä epäpuhtausmenetelmä vesirokkovoiteelle. Tämä menetelmä havaitsee epäpuhtaudet, mutta menetelmää ei ole vielä validoitu epäpuhtauksille.

Menetelmä voidaan kuitenkin ottaa tällaisena käyttöön.

- [1] Muiluvuori, Jukka, *Apteekkareita, lääkkeitä ja professoreita*. Porvoo: WS Bookwell Oy. 2005.
- [2] Lasten rokoteopas. *Hyödyllistä tietoa pienten lasten vanhemmille vesirokosta* [verkkodokumentti]. 28.3.2007 [viitattu 10.10.2007]. Saatavissa: <http://www.rokote.fi/lastenrokoteopas/vesirokko.html>.
- [3] Tampere Terveyspalvelut. *Vesirokko* [verkkodokumentti]. 04.05.2005 [viitattu 10.10.2007]. Saatavissa: <http://tampere.terve.com/kysyttyjasairauksia/vesirokko>.
- [4] Kookas Media Oy. *Vesirokko* [verkkodokumentti]. 2007 [viitattu 10.10.2007]. Saatavissa: <http://www.kookas.fi/articles/read/4778>.
- [5] Suomen Apteekkariliitto, *Dispensatorium Fennicum 2004*. Helsinki: Pharma Press Oy. 2004.
- [6] Meurman, Jukka, ym., *Therapia Odontologia*. Forssa: Forssan kirjapaino OY. 1996.
- [7] Havliková, L. ym., HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 43 Issue 3 (2007), s. 1169-1173.
- [8] Rowe, Raymond . Sheskey, Paul . Weller, Paul, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. UK: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association. 2003.
- [9] Görög, Sándor, *Identification and Determination of impurities in Drugs*. Amsterdam: Elsevier science B.V. 2000.
- [10] Lindsay, Sandie, *High Performance Liquid Chromatography*. England: John Wiley & Sons Ltd. 1992.
- [11] Riekkola, Marja-Liisa . Hyötyläinen, Tuulia, *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat*. Helsinki: Yliopistopaino. 2000.
- [12] Harris, Daniel, *Quantitative chemical analysis*. New York: W.H.Freeman and Company. 2003.
- [13] Jaarinen, Soili . Niiranen, Jukka, *Laboration analyysitekniikka*. Helsinki: Oy Edita Ab. 1996.
- [14] Dolan, John, The Perfect Method, Part II: Where to Start?. *LC GC europe* 10 (2007), s.504 . 509.
- [15] ICH Expert Working Group. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* [verkkodokumentti] 1994, päivitetty 11.2005 [viitattu 8.11.2007]. Saatavissa: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.



**PDF**  
Complete

*Your complimentary  
use period has ended.  
Thank you for using  
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to  
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ki, Menetelmien ja laitteiden validointi teollisuuden laborato-  
moniste. Rautaruukki Steel. 2002.

[17]

Waters, *Empower PDA Software Getting Started Guide*. USA: Waters corpo-  
ration. 2002.

## VALMISTESPELIFIKAATIO JA ANALYYSIOHJE

Analyttinen laboratorio

Versio I

Valmisteen nimi <b>Ungt.varicell. DF 2004 voide</b>		Tuotenumero <b>VA0082</b>	Jakelu: analyttinen laboratorio
pvm/laatija 24.09.2007 Marjut Hiltunen	pvm/tarkastaja	pvm/ hyväksyjä	

**Koostumus**

Methyl.parahydroxybenz.	1,5 mg
Levomenthol.	5,0 mg
Ethanol. (96 per cent.)	40,0 mg
Chlorhexidin.digluconat.sol.	50,0 mg
Decyl.oleas	50,0 mg
Alcohol cetylic.et stearylic.emulsific.A	150,0 mg
Aq.purif.	703,5 mg
	1 g

**1. KUVAUS**

Valkoinen, miedosti mentolille tuoksuva voide.

**2. TOTEAMINEN**

Tehdään pitoisuusmäärityksen yhteydessä HPLC:llä. Näyteliuoksen klooriheksidiiniipikin retentioaika vastaa standardiliuoksen klooriheksidiiniipikin retentioaikaa.

**2. PITOISUUS**

Nestekromatografinen menetelmä.

**Reagenssit ja standardit:**

1. ACN
2. Ammoniumasetaatti,  $C_2H_7NO_2$
3. Chlorhexidin.diglucon.sol. in-house -standardi
4. Muurahaishappo
5. Propanoli
6. Ammoniumasetaattipuskuri, pH 3: Punnitaan 3,85 g  $C_2H_7NO_2$  1000 ml:n mittapulloon ja liuotetaan veteen. Täytetään merkkiin vedellä. pH säädetään muurahaishapolla.
7. Laimennosliuos: 50 : 50 propanoli : vesi
8. Ajoliuos: 35 : 65 ACN : ammoniumasetaattipuskuri pH 3



## VALMISTESPELIFIKAATIO JA ANALYYSIOHJE

Versio I

Valmisteen nimi <b>Ungt.varicell. DF 2004 voide</b>		Tuotenumero <b>VA0082</b>	Jakelu: analyttinen laboratorio
pvm/laatija 24.09.2007 Marjut Hiltunen	pvm/tarkastaja	pvm/ hyväksyjä	

**Ajo-olosuhteet:**

Kolonne: Gemini C-18; 4,6 x 150 mm; 5 µm, LA 260 tai vastaava  
Injektioilavuus: 10 µl  
Virtausnopeus: 0,6 ml/min  
Aallonpituus: 239 nm  
Ajoaika: 10 min  
Ajoliuos: 35 ACN  
65 ammoniumasetatipuskuri, pH 3

**Standardiliuosten valmistus:**

Valmistetaan kaksi erillistä kantaliuosta. Toisesta kantaliuoksesta (ST-1) valmistetaan kalibrintistandardit A ja B (80% ja 120%) ja toisesta (ST-2) tarkistusstandardi C (100%).  
Valutetaan standardiliuokset hitaasti täysipeteistä mittapulloihin.

Kantaliuos 1 ja 2:

Punnitaan tarkasti 100 mg klooriheksidiini In-house –standardia 100 ml:n mittapulloon. Täytetään merkkiin laimennosliuoksella. (1 mg/ml)

## Standardiliuos A (80%):

Kantaliuosta 1 laimennetaan 2,0 ml 10 ml:ksi laimennosliuoksella (vahvuus n. 0,20 mg/ml).

## Standardiliuos B (120%):

Kantaliuosta 1 laimennetaan 3,0 ml 10 ml:ksi ajoliuoksella (vahvuus n. 0,30 mg/ml).

## Standardiliuos C (100%):

Kantaliuosta 2 laimennetaan 5,0 ml 20 ml:ksi ajoliuoksella (vahvuus n. 0,25 mg/ml).

Standardiliuokset suodatetaan 0,45 µm suodattimella.

**Näytteiden valmistus**

Punnitaan tarkasti 0,25 g näytettä 50 ml:n mittapulloon. Lisätään 25 ml propanolia ja pidetään ultraäänihauuteessa 15 minuuttia. Pidetään ravistelijassa 10 minuuttia ja täytetään merkkiin vedellä. Sekoitetaan huolellisesti ja suodatetaan 0,45 µm suodattimen läpi.

# VALMISTESPELIFIKAAATIO JA ANALYYSIOHJE

Analyttinen laboratorio

Versio I

Valmisteen nimi <b>Ungt.varicell. DF 2004 voide</b>		Tuotenumero <b>VA0082</b>	Jakelu: analyttinen laboratorio
pvm/laatija 24.09.2007 Marjut Hiltunen	pvm/tarkastaja	pvm/ hyvksyj	

## Laskut:

$$\text{Standardiliuos A:n konsentraatio (mg/ml)} = \frac{m_{st} \cdot 2,0 \cdot p}{100 \cdot 10 \cdot 100},$$

$$\text{standardiliuos B:n konsentraatio (mg/ml)} = \frac{m_{st} \cdot 3,0 \cdot p}{100 \cdot 10 \cdot 100},$$

$$\text{standardiliuos C:n konsentraatio (mg/ml)} = \frac{m_{st} \cdot 5,0 \cdot p}{100 \cdot 20 \cdot 100},$$

missä  $m_{st}$  = standardiaineen punnitus (mg)

$p$  = standardiaineen pitoisuus %

## Nytteiden laimennuskertoimet:

Dilution: = 50, joka lasketaan laimennuskertoimien avulla:  $\frac{50}{1}$

atogrammi tunnin emäshajotuksen jälkeen



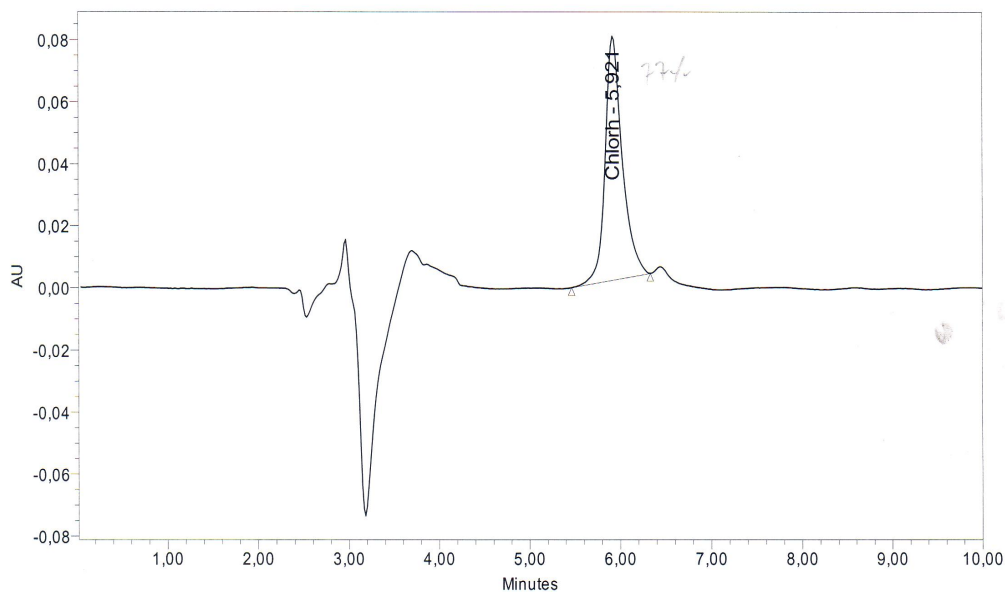
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	NaOH_1h	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	2.10.2007 11:20:31 EEST
Vial:	2	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	2.10.2007 13:57:11 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method:	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name:	hajotuskoe1h	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,921	1029128	78813	0,210954	mg/g
2	Mphb	7,161				

ammi kahden tunnin emäshajotuksen jälkeen



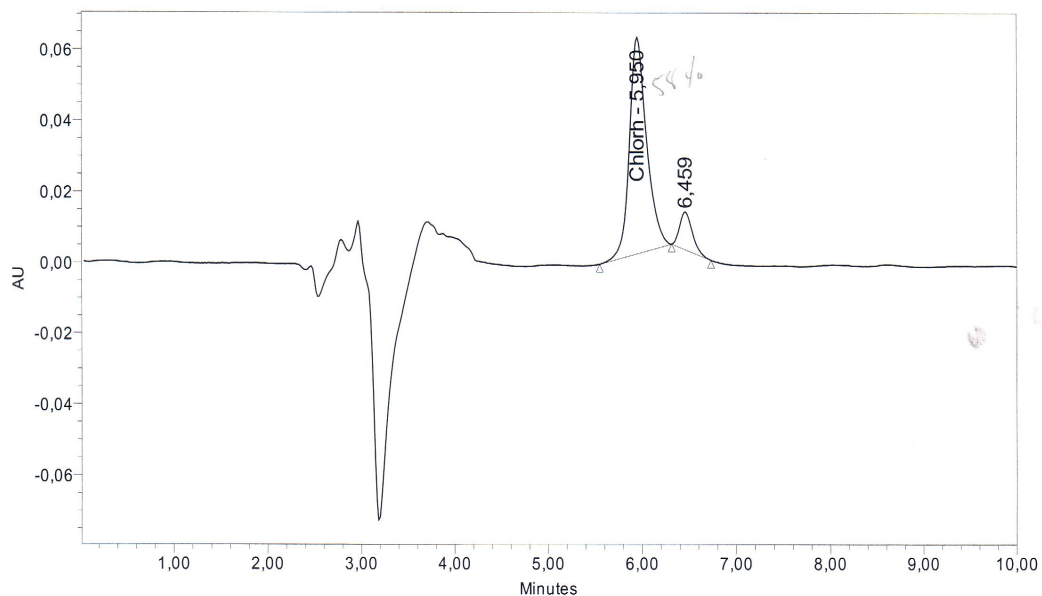
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	NaOH_2h	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	2.10.2007 12:05:46 EEST
Vial:	5	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	2.10.2007 14:04:15 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name	hajotuskoe_2h	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,950	775397	61063	0,161702	mg/g
2		6,459	100221	10647		
3	Mphb	7,161				

mmmi kolmen tunnin emäshajotuksen jälkeen



## Raportointi

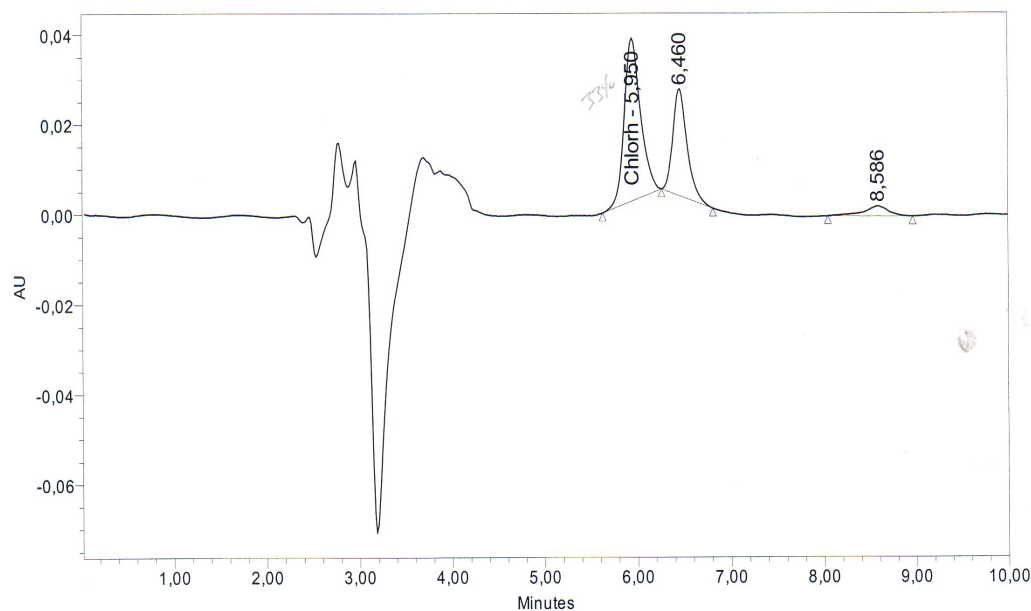
Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name: NaOH\_3h  
 Sample Type: Unknown  
 Vial: 10  
 Injection #: 1  
 Injection Volume: 10,00 ul  
 Run Time: 10,0 Minutes  
 Sample Set Name hajotuskoe\_3h

Acquired By: Marjut  
 Date Acquired: 2.10.2007 13:07:30 EEST  
 Acq. Method Set: klooriheksidiini2  
 Date Processed: 2.10.2007 14:05:56 EEST  
 Processing Method opinnäytetyö  
 Channel Name: 239 nm  
 Proc. Chnl. Descr.: PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,950	441410	36260	0,096870	mg/g
2		6,460	252742	23857		
3	Mphb	7,161				
4		8,586	39935	2159		



atogrammi tunnin happohajotuksen jälkeen



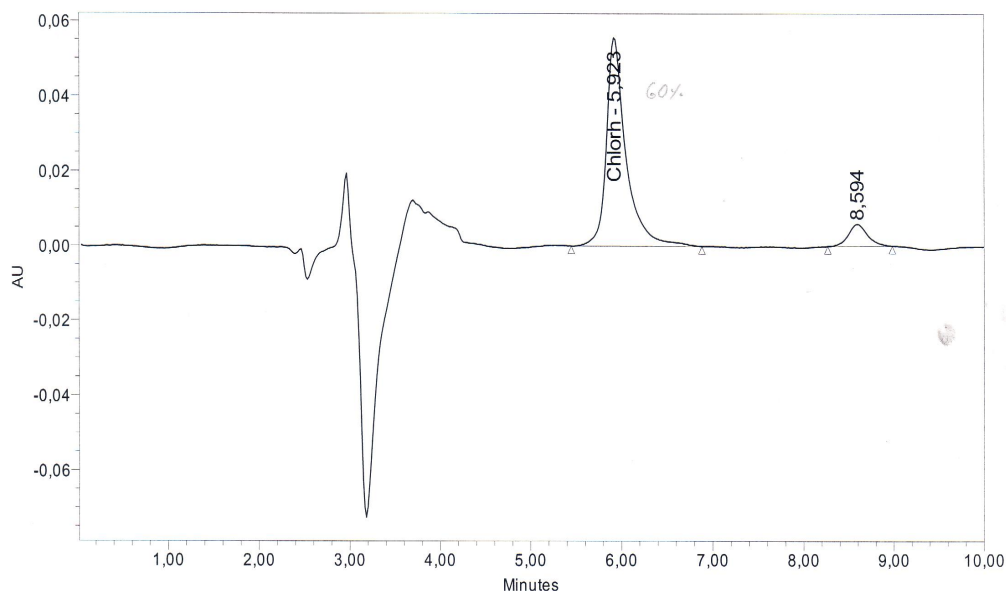
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	HCl_1h	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	2.10.2007 11:31:20 EEST
Vial:	3	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	2.10.2007 13:57:12 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name	hajotuskoe1h	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,923	833202	55799	0,172922	mg/g
2	Mphb	7,161				
3		8,594	88060	5891		

grammi kahden tunnin happohajotuksen jälkeen



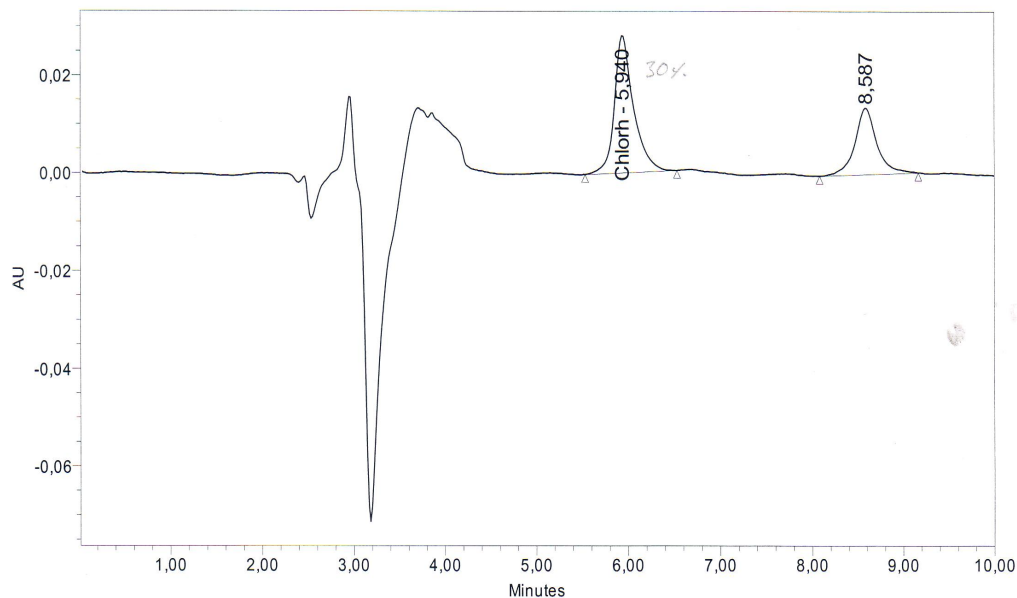
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	HCl_2h	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	2.10.2007 12:16:36 EEST
Vial:	6	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	2.10.2007 14:04:16 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method:	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name:	hajotuskoe_2h	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,940	407133	28237	0,090217	mg/g
2	Mphb	7,161				
3		8,587	231207	13683		

mmmi kolmen tunnin happohajotuksen jälkeen



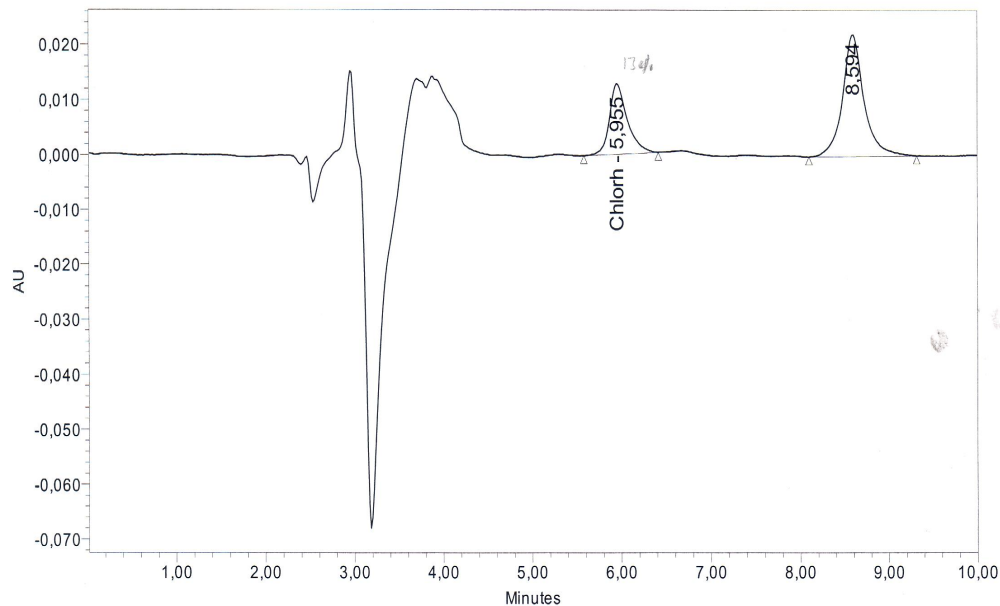
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	HCl_3h	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	2.10.2007 13:18:21 EEST
Vial:	11	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	2.10.2007 14:05:58 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name	hajotuskoe_3h	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,955	177785	12837	0,045697	mg/g
2	Mphb	7,161				
3		8,594	375681	22116		



atogrammi tunnin peroksidihajotuksen jälkeen



## Raportointi

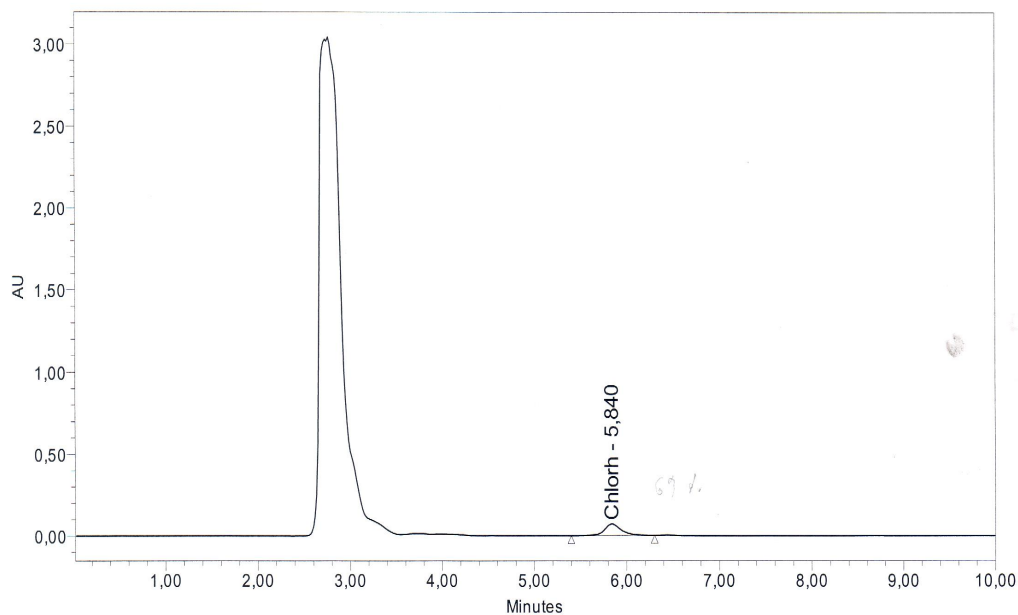
Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name: h2o2\_1h\_100  
Sample Type: Unknown  
Vial: 1  
Injection #: 1  
Injection Volume: 10,00 ul  
Run Time: 10,0 Minutes  
Sample Set Name hajotuskoe\_h2o2\_100

Acquired By: Marjut  
Date Acquired: 4.10.2007 10:11:49 EEST  
Acq. Method Set: klooriheksidiini2  
Date Processed: 4.10.2007 12:00:19 EEST  
Processing Method: opinnäytetyö  
Channel Name: 239 nm  
Proc. Chnl. Descr.: PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,840	919831	71806	0,189738	mg/g
2	Mphb	7,161				

atogrammi kahden tunnin peroksidihajotuksen jälkeen



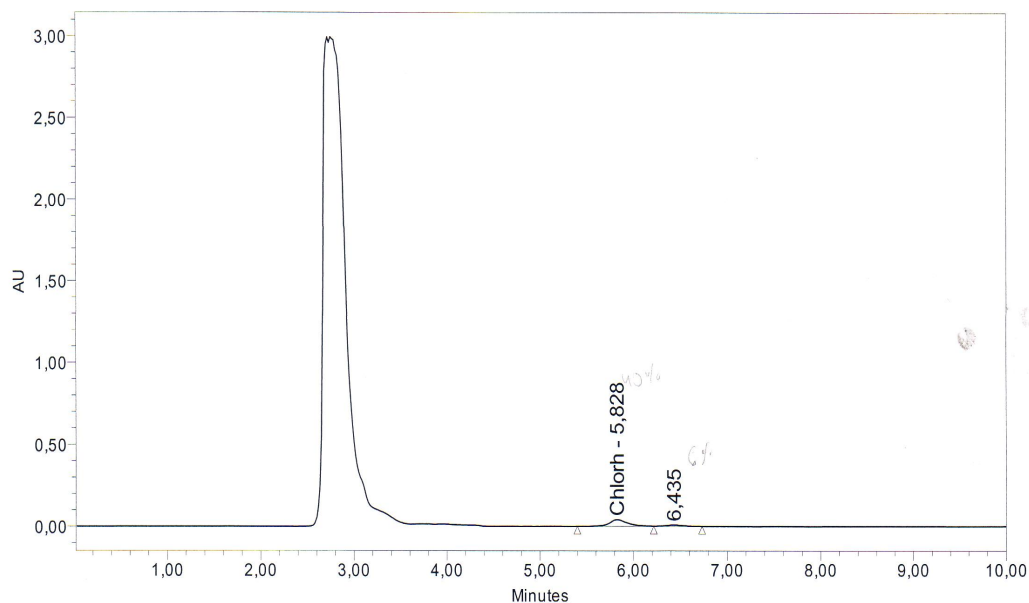
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	h2o2_2h_100	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	4.10.2007 10:42:52 EEST
Vial:	2	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	4.10.2007 12:00:20 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name	hajotuskoe_h2o2_100	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,828	528498	40359	0,113775	mg/g
2		6,435	79183	7500		
3	Mphb	7,161				

atogrammi kolmen tunnin peroksidihajotuksen jälkeen



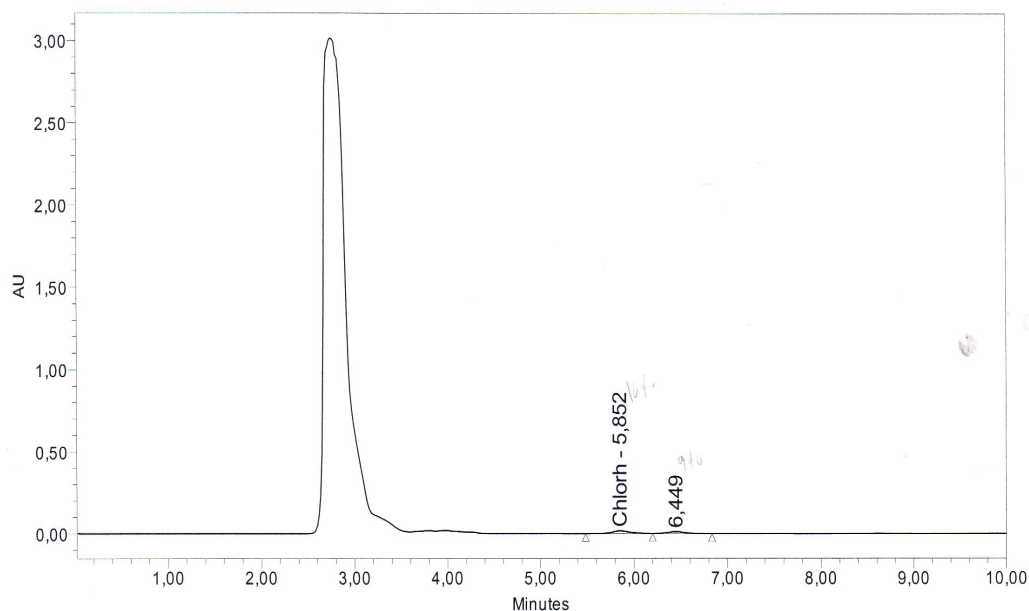
## Raportointi

Reported by User: Marjut Hiltunen (Marjut)

Project Name: opinnäytetyö

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	h2o2_3h_100	Acquired By:	Marjut
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	4.10.2007 11:34:37 EEST
Vial:	4	Acq. Method Set:	klooriheksidiini2
Injection #:	1	Date Processed:	4.10.2007 12:00:24 EEST
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method	opinnäytetyö
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	239 nm
Sample Set Name	hajotuskoe_h2o2_100	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 239,0 nm



### Tulokset

	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Chlorh	5,852	211302	16738	0,052203	mg/g
2		6,449	121816	11004		
3	Mphb	7,161				